# Untersuchungen über die Komplementbindungsreaktion bei Paratuberkulose mit Antigenen aus verschiedenen Paratuberkelbakterienstämmen.

Ingeborg Schwarz

Aus dem Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

# Untersuchungen über die Komplementbindungsreaktion bei Paratuberkulose mit Antigenen aus verschiedenen Paratuberkelbakterienstämmen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

von
Ingeborg Schwarz
aus
Neutrebbin

München 1957

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. Liebmann

Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 24. Juli 1957

## Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung . . . . . 5

II. Zur Epidemiologie und Bekämpfung der Paratuberkulose . . . . . 7

III. Diagnose der Paratuberkulose am lebenden Tier . . . . . 11

1. Klinische Diagnose . . . . . 11

2. Bakteriologische Diagnose . . . . . 12

3. Allergische Diagnose . . . . . 14

4. Serologische Diagnose . . . . . 17

IV. Eigene Untersuchungen

A. Methodik und Material . . . . . 24

1. Vorbereitung der Komponenten für die Komplementbindungsreaktion 26

2. Durchführung der Reaktion . . . . . 31

3. Antigenherstellung . . . . . 36

a) Bearbeitung durch Mörser . . . . . 39

b) Homogenisator 5 Minuten . . . . . 42

c) Homogenisator 15 Minuten . . . . . 45

d) Karbolsäureextraktion . . . . . 47

B. Diagnostische Untersuchungen von Blutproben mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion unter Verwendung verschiedener Antigene und deren Vergleich . . . . . 52

C. Besprechung der Untersuchungsergebnisse . . . . . 73

V. Zusammenfassung . . . . . 75

VI. Literaturübersicht . . . . . 77

Lebenslauf . . . . . 82

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555403_0045

# I. Einleitung.

Seitdem die Paratuberkulose als eine selbständige, spezifische Erkrankung der Wiederkäuer erkannt worden ist, wurde auch auf die Unsicherheit und die Schwierigkeiten bei der frühzeitigen Diagnose der Paratuberkulose hingewiesen. Pathologisch-anatomische und histologische Untersuchungen ermöglichen zwar in der Regel eine sichere Feststellung der Erkrankung bei toten Tieren, bei lebenden Tieren dagegen gelingt die Diagnose meistens nur durch die Anwendung mehrerer Untersuchungsmethoden und unter Berücksichtigung der Seuchenlage im Bestand.

Die Methoden der Diagnose während des Lebens sind die klinische Untersuchung, der Nachweis der Bakterien im Kot und in Teilen der Darmschleimhaut, die allergische Probe und die serologische Untersuchung des Blutes in der Komplementbindungsreaktion.

Da in Deutschland die Komplementbindungsreaktion zur Diagnose der Paratuberkulose noch wenig angewendet wurde, hat mir Herr Professor Dr. A. Meyn die Aufgabe gestellt, Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit dieser Methode durchzuführen und verschiedene Paratuberkelbakterienstämme auf ihre Eignung als Antigene zu prüfen.

## II. Zur Epidemiologie und Bekämpfung der Paratuberkulose.

Die Paratuberkulose (Johnesche Krankheit) tritt hauptsächlich bei Rindern und Schafen, seltener bei Ziegen auf und kann auch wildlebende Tiere, wie Reh, Hirsch und Antilope, befallen.

Über das Auftreten der Paratuberkulose in Deutschland berichtet Huber (1941). Er findet sie mit wenigen Ausnahmen über das ganze Land verbreitet. In Westdeutschland tritt die Seuche vor allem in Oldenburg und Westfalen, aber auch in Hannover, Bremen und vereinzelt in den süddeutschen Ländern auf. Trotz der weiten Verbreitung ist das Auftreten der Paratuberkulose in Deutschland nicht allzu häufig beobachtet worden. Daß in neuerer Zeit die Zahl der erkannten Erkrankungsfälle ansteigt, ist einerseits durch die Verbesserung der diagnostischen Untersuchungsmethoden und andererseits durch die fortgeschrittene Tilgung der Rindertuberkulose bedingt, denn ohne Zweifel sind in tuberkuloseverseuchten Beständen Verluste durch Paratuberkulose vielfach der Tuberkulose zugeordnet worden.

Auch in nahezu allen anderen europäischen Ländern sowie in Amerika, Südafrika, Australien und Asien ist die Seuche bekannt und stellt in einigen Ländern die Ursache bedeutender wirtschaftlicher Verluste dar. Es ließe sich also annehmen, daß sie unabhängig von klimatischen und geologischen Verhältnissen und auch von Haltungs- und Fütterungsbedingungen über die ganze Welt verbreitet ist. Andererseits tritt sie aber gehäuft in Gebieten mit intensiven Wirtschaftsbetrieben auf und hier sind mitunter einzelne Gehöfte besonders stark verseucht.

Diese Beobachtungen und besonders die Tatsache, daß die Infektion mit Paratuberkelbakterien in bedeutend stärkerem Maße verbreitet ist als die paratuberkulöse Erkrankung, haben zu der Vermutung geführt, daß noch andere Ursachen als die Infektion mit Paratuberkelbakterien allein notwendig sind, um die Erkrankung hervorzurufen. Taylor (1951) betont, daß zwischen der Infektion und der Johneschen Krankheit unterschieden werden muß, und daß zahlenmäßig kaum eine Beziehung zwischen beiden besteht. Über die Ursache, warum nur eine geringe Anzahl der infizierten Tiere zu klinischen Fällen wird und welches die „Auslöse-Mechanismen“ sind, können keine sicheren Angaben gemacht werden.

Es wird von verschiedenen Autoren angenommen, daß die **Bodenbeschaffenheit** und damit auch die **Futterverhältnisse** von Einfluß auf das Auftreten der klinischen Erscheinungen sind. Spicer (1933, 1934, 1934) sieht den Mangel an Mineralsalzen im Futter als prädisponierende Ursache an. Kälber, die von derartig gefütterten Kühen geboren werden und die

Milch dieser Kühe saugen, kommen schon geschwächt zur Welt, erholen sich niemals und erkranken später selbst. In einer stark verseuchten Herde traten nach regelmäßiger Zufütterung von Mineralsalzen keine klinischen Fälle mehr auf, woraus Spicer schließt, daß auf diese Weise die Johnesche Krankheit verhindert werden kann. Jansen (1948) hat in den Niederlanden beobachtet, daß in stark befallenen Gegenden der Kalziumgehalt und der PH-Wert des Bodens niedriger sind als in wenig verseuchten oder freien Bezirken. Auch v. d. Schaaf glaubte zunächst, daß der Mineralmangel des Bodens, insbesondere der Mangel an Kupfer und Mangan, Einfluß auf die Erkrankung hat. Er stellte dann aber fest, daß der Sandboden gering verseuchter Gebiete keinen höheren Mineralgehalt hatte als der schwere Boden stark befallener Gegenden. Ferner beobachtete er eine weniger starke Verbreitung der Paratuberkulose in Betrieben mit gemischtem Ackerbau.

Nach Behrens (1955) tritt in Deutschland die Paratuberkulose der Schafe vermehrt bei einseitiger Fütterung mit Trockenschnitzeln, Rübenblattsilage und mineralstoffarmem Heu auf. Gleiche Berichte liegen aus Frankreich vor, worin auch besonders der Einfluß saurer Weiden hervorgehoben wird. Schaaf und Mitarbeiter (1956) berichten, daß die Paratuberkulose der Rinder im Reg.-Bezirk Arnsberg am stärksten in den Gegenden der guten Böden mit intensivem Rübenbau auftritt, während im Sauerland bei wenig intensiver Winterfütterung und reichlicher Verabreichung von Heu nur eine geringe Anzahl klinischer Fälle bekannt wird. Es kann also zusammenfassend gesagt werden, daß einseitige und intensive Fütterung, saure Weiden und schlechtes, mineralstoffarmes Heu das Auftreten der klinischen Erscheinungen bei der Paratuberkulose begünstigen.

Auch **jahreszeitliche Schwankungen** mit gehäuftem Auftreten der Paratuberkulose im Spätherbst und Frühjahr können mit großer Wahrscheinlichkeit als fütterungsbedingt angesehen werden.

Hinzu kommen noch **konstitutionsschwächende Einflüsse,** wie unzureichende Ernährung, Überanstrengung, Schwergeburten, hohe Milchleistung und Parasitenbefall.

Eine besondere Bedeutung für den Ausbruch der klinischen Erkrankung hat auch das **Lebensalter.** Von allen Autoren wird übereinstimmend angegeben, daß selten Rinder im Alter von weniger als 1½ bis 2 Jahren erkranken. Doyle und Spears (1951) geben eine Zusammenstellung über das Alter der Tiere von 648 klinischen Fällen. Die Spitze der Erkrankungsfälle liegt im dritten bis fünften Lebensjahr mit jährlich 27 % der Rinder dieser Altersstufe. Von 70 Kälbern bis zu einem Jahr waren

nur 9 % erkrankt. Eine gleichsinnige Übersicht stellte v. d. Schaaf auf. Danach sind 10 % der erkrankten Tiere jünger als zwei Jahre, 45 % zwei bis 5 Jahre, 35 % sechs bis acht Jahre und 10 % über acht Jahre alt.

Obwohl die paratuberkulöse Erkrankung in der Mehrzahl der Fälle erst im späteren Alter der Tiere in Erscheinung tritt, sind sowohl für die natürliche als auch für die künstliche **Infektion** die ersten Lebensmonate der günstigste Zeitpunkt. Hagan (1938) stellte fest, daß sich kein Kalb auf natürlichem Wege infizierte, wenn es nach dem vierten Monat in eine infizierte Herde gebracht wurde. Ein weiteres Beispiel dafür, daß die natürliche Infektion vor allem im frühen Jugendalter zustande kommt, geben auch v. d. Schaaf und Zantinga (1955) an. Sie beobachteten, daß zwei Kälber, die in einer infizierten Herde geboren worden waren und im Alter von drei Wochen einzeln in zwei freien Beständen aufgestellt wurden, mit etwa drei Jahren wegen Paratuberkulose geschlachtet werden mußten. Die künstliche Infektion erwachsener über fünf Jahre alter Kühe ist allerdings Doyle (1953) gelungen. Von 6 Kühen aus einem Bestand, in dem niemals Paratuberkulose herrschte und der seit Jahren frei von Tuberkulose war, erkrankten 2 Tiere nach der Infektion eindeutig, während bei 2 anderen wohl klinische Erscheinungen auftraten, aber das Vorliegen der Infektion durch die Schlachtung nicht sicher nachgewiesen werden konnte. 2 Kühe erkrankten nicht.

Aus allen Übertragungsversuchen, die von verschiedenen Autoren vorgenommen wurden, resultiert eindeutig, daß junge Tiere für die Infektion sehr empfänglich sind. Entsprechende Verhältnisse sind nach den bisherigen Kenntnissen auch für die natürliche Infektion anzunehmen. Kälber und insbesondere Saugkälber, die im gleichen Stall wie die Kühe gehalten werden, sind der Infektionsgefahr besonders stark ausgesetzt, da zeitweise auch schon im vorklinischen Stadium der Erkrankung massenhaft Paratuberkelbakterien von infizierten Kühen im Kot ausgeschieden werden können.

Als hauptsächliche **Ansteckungsquelle** wird übereinstimmend mit paratuberkelbakterienhaltigem Kot verschmutztes Trinkwasser und Futter angesehen. Für Saugkälber stellt auch das beschmutzte Muttertier selbst eine Gefahr dar. Die Übertragungsmöglichkeit ist also vorwiegend bei der Stallhaltung und vor allem durch das Halten der Tiere in Tiefställen gegeben, aber auch Weideinfektionen können in größerem Umfang auftreten. Hier wirken sich gemeinsame, offene Tränkstellen für alle Tiere, die stets stark mit Kot verschmutzt sind, besonders verhängnisvoll aus. Schaaf und Mitarbeiter (1956) heben auch die unsachgemäße Beschickung der Umtriebsweiden hervor. Durch das Nachweidenlassen der Jungtiere in verseuchten Beständen werden günstige Voraussetzungen für die Verbreitung der Seuche geschaffen.

Die Klärung der Frage, ob die Bakterien auch mit der Milch ausgeschieden werden und somit die infizierte Milch eine direkte Ansteckungsquelle für die Kälber darstellt, bedarf nach Meyn (1953) noch weiterer Untersuchungen.

Pearson und Mc Clelland (1955) weisen darauf hin, daß bei der Bekämpfung der Paratuberkulose auch die Möglichkeit einer kongenitalen Infektion beachtet werden muß. Sie haben zwei Kühe, die als Blutreagenten ermittelt worden waren, aber keine klinischen Erscheinungen zeigten, drei Wochen vor der Geburt ihres dritten Kalbes geschlachtet. In einem Fall konnte sowohl bei der Kuh als auch bei dem ungeborenen Kalb die Infektion nachgewiesen werden, während die zweite Kuh und auch ihr Kalb negativ waren. Eine dritte Kuh, die zweimal verworfen hatte, wurde nach Ablauf der dritten normalen Trächtigkeitsperiode geschlachtet. Bei diesem Tier konnten außer in der Darmschleimhaut und in den Mesenteriallymphknoten, auch in der Uterusschleimhaut Paratuberkelbakterien nachgewiesen werden, ohne daß aber anatomische Veränderungen vorhanden waren. Doyle hat 20 Föten von klinisch verdächtigen Kühen untersucht. Er erhielt von 10 Föten positive Kulturen, 5 waren negativ und bei 5 war die Untersuchung zur Zeit des Berichtes noch nicht abgeschlossen. Die Paratuberkelbakterien konnten aus der Leber und der Milz der Föten oder aus den Kotyledonen der Eihäute isoliert werden.

Versuche einer medikamentösen **Behandlung** der Paratuberkulose sind bis heute ohne jeden Erfolg geblieben. Wohl haben Larsen, Vardaman und Groth (1950) festgestellt, daß Streptomycin in vitro in verhältnismäßig schwacher Konzentration eine abtötende Wirkung auf das M. paratuberculosis hat, aber Behandlungsversuche an zwei Färsen und zwei Kühen mit fortgeschrittener Paratuberkulose blieben erfolglos. Es trat zwar zunächst eine leichte Besserung des Zustandes ein, die aber von einem Rückfall, der zum Tode der Tiere führte, gefolgt war. Eine geringe Wirkung gegen M. johnei in vitro beobachtete Rankin (1953) bei Versuchen mit Isoniazid.

Wegen der Unmöglichkeit, die Paratuberkulose therapeutisch zu beeinflussen, ist die **Bekämpfung** der Seuche vorwiegend auf hygienische Maßnahmen, auf ansteckungsfreie Aufzucht der Kälber sowie Isolierung und Ausmerzung der verdächtigen und als infiziert erkannten Tiere begründet. Die Ausmerzung der infizierten, nicht nur der klinisch erkrankten Tiere kann sich aber nur auf eine sichere, frühzeitige Diagnose der Paratuberkulose stützen. Die Diagnose am lebenden Tier ist wegen der langen Inkubationszeit und des schleichenden Krankheitsverlaufes sowie wegen der häufig auftretenden latenten Infektionen äußerst schwierig, da es bis heute keine absolut zuverlässigen Untersuchungsmethoden gibt.

## III. Diagnose der Paratuberkulose am lebenden Tier.

### 1. Klinische Diagnose

Es liegt in der Natur der paratuberkulösen Erkrankung der Rinder, daß die klinische Diagnose keine große Bedeutung für die Bekämpfung hat, da die ausgeprägten klinischen Erscheinungen erst im vorgeschrittenen Stadium der Erkrankung in Erscheinung treten. Abgesehen von dieser Tatsache sind solche Krankheitserscheinungen aber auch keineswegs nur für Paratuberkulose charakteristisch, sondern sie können auch durch Darmparasiten, durch Salmonellen oder durch Fütterungsfehler verursacht werden. (Meyn 1953, v. d. Schaaf 1956, Schaaf und Mitarbeiter 1956).

Nach einer lang andauernden Inkubationszeit erkranken die Kühe am häufigsten im Alter von 3—5 Jahren, und zwar meist im Anschluß an eine besondere Belastung des befallenen Organismus, die durch Trächtigkeit und Geburt sowie durch ungünstige oder veränderte Haltungs- und Fütterungsbedingungen gegeben sein kann.

Die ersten klinischen Erscheinungen sind sehr undeutlich und werden nur von aufmerksamen, mit der Paratuberkulose vertrauten Besitzern beobachtet. Sie äußern sich in Blässe der Euterhaut, ungenügender Füllung des Euters bei der Geburt eines oft kleinen Kalbes und geringerer Milchleistung (v. d. Schaaf).

Bald entwickelt sich dann das charakteristische Krankheitsbild mit dem Auftreten eines profusen Durchfalls, insbesondere dann, wenn sehr konzentriertes Futter zur Steigerung der Milchleistung verabreicht wird.

Anfänglich tritt der Durchfall häufig intermittierend auf und kann für längere Zeit gänzlich verschwinden. Die Kotentleerungen erfolgen unter Drängen in kleinen Mengen, können aber auch unwillkürlich stattfinden, wenn eine Mastdarmparese vorliegt. Der Kot wird dünnbreiig und schließlich flüssig-wässerig, er ist mit Gasbläschen und zeitweise auch mit Schleimflocken durchsetzt und hat einen faulig-stinkenden Geruch. Frühzeitig tritt eine Verminderung der Milchsekretion ein, die bis auf ein Drittel und ein Viertel absinken kann.

Obwohl im Beginn der Erkrankung das Allgemeinbefinden wenig gestört ist, kommt es trotz guter Futteraufnahme zu allmählicher Abmagerung. Mit dem Fortschreiten der Krankheit tritt der Durchfall immer häufiger auf und wird schließlich unstillbar, es kommt zu hochgradiger Abmagerung der Tiere, dabei wird das Haarkleid struppig, glanzlos und die Haut lederbündig (Hutyra und Marek 1952).

Hautödeme am Triel und Kehlgang sind nur selten zu beobachten, und zwar handelt es sich dann meist um nichttypische Fälle ohne Durchfall,

wie v. d. Schaaf (1956) beobachtet hat. Twort und Ingram (1912) berichten, daß bei künstlich infizierten Kälbern sechs Monate nach der Infektion klinische Erscheinungen ohne Durchfall auftraten. Die Tiere magerten ab, waren stark geschwächt und hatten eine lederbündige Haut. Auch B. Bang (1906) hat einige Fälle beobachtet, in denen die Tiere unter Anaemie und Abmagerung schließlich verendeten, ohne daß bei ihnen Durchfall aufgetreten wäre.

Im Endstadium der Krankheit ist das Allgemeinbefinden wesentlich gestört, die Tiere sind müde und kraftlos. In diesem Stadium liegen die erkrankten Tiere viel, erheben sich nur mühsam und gehen schließlich infolge allgemeiner Entkräftung zugrunde.

Die Erkrankung verläuft fieberlos. Die Schleimhäute werden blaß, der Hämoglobingehalt des Blutes nimmt ab. Meyer, K. F. (1908), hat ein Absinken des Hämoglobingehaltes um 60 % festgestellt.

Der Verlauf der klinischen Erkrankung kann sich unter zeitweiligen Besserungen des Zustandes über Monate und sogar über einige Jahre erstrecken. In Ausnahmefällen tritt der Tod schon nach einigen Tagen oder Wochen ein. Taylor (1951) spricht in diesen Fällen vom akuten, septikämischen Typ der Krankheit, der durch eine akute hämorrhagische Enteritis mit dem Abgang von Blut und großen Bakterienmengen charakterisiert ist.

Eine dauernde Besserung des Leidens wird vereinzelt beobachtet, so berichtet Meyer, K. F. (1908), daß eine Kuh nach einem Abort an Durchfall, Abmagerung und Anämie erkrankte. Die Erscheinungen verschwanden nach einiger Zeit und das Tier konnte gemästet werden. Die Zerlegung ergab eindeutig das Vorliegen von Paratuberkulose. Nach v. d. Schaaf ist es Zantinga gelungen, in frischen Erkrankungsfällen durch Diät die Erscheinungen vollkommen zum Verschwinden zu bringen. Diese Fälle sind aber nicht als echte Ausheilungen zu werten. Es handelt sich vielmehr um ein vorklinisches Stadium, in dem die Erreger weiterhin, wenn auch in geringerer Zahl, im Kot vorhanden sind.

Das Erkrankungsbild bei Schafen ähnelt mit all seinen Erscheinungen dem des Rindes, nur mit dem Unterschied, daß die Tiere meist sehr frühzeitig verenden (Meyn 1953, Behrens 1955).

## 2. Bakteriologische Diagnose

Die Ausscheidung der Erreger der Paratuberkulose mit dem Kot erfolgt nicht kontinuierlich. Das bedingt eine Erschwerung des mikroskopischen Nachweises der Bakterien und macht bei negativem oder zweifelhaftem Ausfall der Untersuchung eine mehrfache Wiederholung der Prüfung notwendig.

Gut bewährt hat sich die Vorbehandlung des zu untersuchenden Kotes mit Antiformin (Meyer, K. H. 1926, Meyn 1953, Schaaf und Mitarbeiter 1956); mit dieser Methode konnte Meyer, K. F. (1914), in nahezu 65 % der untersuchten Tiere die Diagnose sichern. Lewi (1948) untersuchte 91 mit Antiformin behandelte Kotproben von paratuberkuloseverdächtigen Rindern und erzielte durch die mikroskopische Untersuchung 38 % positive und 36 % zweifelhafte Resultate. Dagegen hält Taylor (1951) die Prüfung der direkten Kotausstriche für besser geeignet, da durch die Anreicherungsmethoden nicht nur die Johne'schen Bakterien konzentriert werden, sondern auch die säurefesten Saprophyten, die in größerer Anzahl vorkommen können und den Untersucher dann irritieren. Außerdem wird die diagnostisch maßgebliche Lagerung der Erreger in Nestern durch die Anreicherung mit Antiformin oder anderen Mitteln zerstört. Taylor konnte bei seinen Arbeiten mit Versuchsrindern keine typischen Bakteriennester im Kot finden, bevor die Tiere deutlich erkrankt waren.
Auch Doyle und Spears (1951) untersuchten direkte Kotausstriche. Sie haben auf diese Weise 3815 Kotproben verdächtiger Tiere geprüft, von denen 25 % positiv, 19 % verdächtig und 54 % negativ waren. Eine andere Untersuchungsmethodik wird von v. d. Schaaf und Zantinga (1955) angegeben. Sie vermischen den Kot mit gleichen Teilen einer 10 %igen NaOCl-Lösung, lassen diese Mischung etwa 15 Stunden stehen und untersuchen die vom Sediment der Kotsuspension angefertigten Ausstriche. Auf diese Weise wurden in 27 % der Kotproben verdächtiger Rinder Paratuberkelbakterien ermittelt. Durch wiederholte Untersuchungen von Proben nicht verdächtiger Tiere konnten 0,7 % positive Fälle festgestellt werden.

In den Fällen, in denen der Mastdarm miterkrankt ist, ist für den Nachweis der Bakterien die Untersuchung exstirpierter Schleimhautstückchen sicherer als die Untersuchung des Kotes.

Die kulturelle Prüfung von Kotproben auf das Vorhandensein von Paratuberkelbakterien setzt eine Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials mit Antiformin oder anderen Mitteln und die Verwendung geeigneter Nährböden, die einen Zusatz von abgetöteten Mycobakterien enthalten, voraus. Da aber die Erstisolierung von Paratuberkelbakterien schwierig ist und ein positives Ergebnis frühestens nach 6 Wochen Bebrütungszeit erhalten werden kann, hat diese Methode als routinemäßige diagnostische Untersuchung nur geringen Wert (Taylor 1951, Meyn 1953, Schaaf und Mitarbeiter 1956).

Die Kotuntersuchung gestattet im positiven Fall eine sichere und schnelle Diagnose, dagegen kann durch ein negatives Ergebnis die Infektion mit Paratuberkelbakterien nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Nach-

teil liegt darin, daß die Keimausscheidung oft periodisch erfolgt und Wiederholungsuntersuchungen notwendig werden, da die erste Prüfung nur in etwa 30 % der Fälle ein positives Ergebnis zeitigt.

### 3. Allergische Diagnose

Die allergische Reaktion ist zwar von großer Bedeutung für die Diagnose am lebenden Tier, aber auch sie bietet nicht die erforderliche Sicherheit für eine erfolgreiche Bekämpfung. O. Bang (1909) wies zuerst auf den Wert des Geflügeltuberkulins zur Erkennung der Paratuberkulose hin. Er stellte fest, daß die infizierten Tiere auf die subkutane Injektion von Geflügeltuberkulin in derselben Weise mit Temperaturerhöhung reagieren wie tuberkulöse Rinder auf die Einimpfung von Tuberkulin. Bang prüfte zunächst 20 erkrankte Rinder, bei denen die positiven Ergebnisse durch den Zerlegungsbefund bestätigt werden konnten, und dehnte seine Untersuchungen danach auf drei tuberkulosefreie Bestände aus, in denen die Paratuberkulose stark verbreitet war. In diesen Beständen reagierten rund 33 % der Milchkühe und 7 % der Jungtiere. Bang wies schon damals auf die Schwierigkeiten hin, die bei der Anwendung des Geflügeltuberkulins in nicht tuberkulosefreien Beständen bestehen und betonte, daß auch die Anwendung beider Tuberkuline nicht zu sicheren Ergebnissen führt. Weiterhin beobachtete er, daß bei hochgradig erkrankten Tieren die Reaktionen gering oder negativ waren.
Mc Fadyen, Sheater und Edwards (1912) prüften paratuberkulöse Rinder im vorgeschrittenen Krankheitsstadium ebenfalls durch subkutane Injektionen von Geflügeltuberkulin und erhielten nur bei 14,2 % der erkrankten Tiere positive Reaktionen. Sie maßen deshalb der thermischen Reaktion keine Bedeutung für die Diagnose bei. Dagegen sahen Krautstrunk (1919) und Fortman (1925) in der Anwendung des Geflügeltuberkulins ein wertvolles Hilfsmittel zur Erkennung der Paratuberkulose.

Ein Paratuberkulin wurde zuerst von Twort und Ingram (1912) hergestellt und mit gutem Erfolg als subkutan injiziertes Diagnostikum angewendet. Andersen (1920) führte vergleichende Untersuchungen mit Paratuberkulin und Geflügeltuberkulin durch und fand das Paratuberkulin dem Geflügeltuberkulin überlegen.

Über die erfolgreiche intrakutane Anwendung von Paratuberkulin zur Erkennung der Paratuberkulose berichtet Dunkin (1928, 1933). Alle klinisch verdächtigen Tiere, ausgenommen diejenigen, die sich im Spätstadium der Erkrankung befanden, reagierten positiv, während bei tuberkulösen und gesund erscheinenden Rindern keine charakteristischen Hautverdickungen auftraten. In allen Fällen konnte die Reaktion durch

die Schlachtung bestätigt werden. Dunkin verglich an einer Anzahl paratuberkulinpositiver und tuberkulinnegativer Rinder auf verschiedene Weise hergestellte Paratuberkuline und hält solche von Sautonkulturen ohne Zusatz von Timotheebazillen für am besten geeignet zur Diagnose der Paratuberkulose. Er wiederholt die Injektion von 0,1 ccm Paratuberkulin nach 48 Stunden und beurteilt die Reaktion 24 Stunden später.
Minett (1935) wendete ebenfalls die doppelte Intradermalprobe an und erhielt bei der Prüfung von 59 Rindern in 53 Fällen positive Reaktionen. 6 Tiere, die sich nach der Schlachtung als paratuberkulös infiziert erwiesen, hatten nicht reagiert, aber 4 von diesen befanden sich im sehr vorgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Minett hebt hervor, daß der allergische Zustand des infizierten Tieres erheblich schwanken und daß im frühen Stadium der Infektion sowie in vorgeschrittenen klinischen Fällen die Reaktionsfähigkeit des Tieres fehlen kann. Von Nag (1938) wurden Paratuberkelbakterien auf Sauton'schem Nährboden mit bzw. ohne Zusatz von Timotheebakterien gezüchtet und aus diesen Kulturen Paratuberkuline hergestellt. Nach einer vorhergehenden Prüfung der so zubereiteten Paratuberkuline an künstlich infizierten Ziegen wurden sie zu diagnostischen Zwecken in verseuchten Beständen angewendet. Von 250 Rindern reagierten 24,80 % positiv. Bei 49 Tieren fand die gleichzeitige Anwendung von Paratuberkulin und Tuberkulin statt, wodurch im ersten Fall 20 und im letzteren 9 Reagenten ermittelt wurden. Die auf Paratuberkulin reagierenden Tiere waren niemals jünger als 1½ Jahre.

Von zahlreichen Autoren sind weitere Untersuchungen über den diagnostischen Wert von Geflügeltuberkulin und Paratuberkulin durchgeführt und durchschnittlich 25—30 % Reagenten bei der Testung infizierter Bestände ermittelt worden. Allerdings ist der Prozentsatz nichtspezifischer Reaktionen in einzelnen Herden etwa gleich hoch, aber Taylor (1951) hält es für möglich, daß diese sogenannten nichtspezifischen Reaktionen tatsächlich durch eine wahre Infektion mit M. johnei hervorgerufen werden. Es gelang ihm nämlich, Taylor (1949), bei 15 % gesunder Schlachtrinder Paratuberkelbakterien aus den Iliocaecal-Lymphknoten zu züchten, ohne daß er bei den Tieren pathologisch-anatomische Veränderungen feststellen konnte. Diese Tiere könnten nach Taylor allergische Reagenten sein. Ferner sieht er einen Nachteil des Johnins darin, daß es aus alten Laboratoriumsstämmen hergestellt werden muß, die an das Wachstum ohne Zusatz von M. phlei oder seinem Extrakt adaptiert sind. Die Eigenschaften eines solchen Stammes können von denen eines frisch aus dem Tierkörper isolierten Stammes weit abweichen. Taylor stellte bei seinen eigenen Untersuchungen fest, daß die Tiere 6—12 Monate nach der künstlichen Infektion auf Geflügeltuberkulin reagieren. Säugetiertuberkulin verursacht ebenfalls Reaktionen, sie sind aber nicht so stark wie beim aviären Tuberkulin.

Nach Meyn (1953) ist die Intrakutanprobe unter Verwendung von Geflügeltuberkulin mit einem erheblichen Grad von Unspezifität verbunden, da mit Geflügeltuberkelbakterien infizierte Rinder und zuweilen auch tuberkulöse Tiere eine positive Reaktion geben. Er hält es für zweckmäßig, in nicht tuberkulosefreien Beständen gleichzeitig Paratuberkulin und Tuberkulin auf je einer Halsseite intrakutan zu injizieren. Bei negativer Tuberkulinprobe zeigt die positive Paratuberkulinprobe mit großer Sicherheit die Infektion mit Paratuberkelbakterien an. Nach seinen Erfahrungen sieht Meyn in der diagnostischen Impfung das wertvollste Hilfsmittel zur frühzeitigen Erkennung paratuberkulöser Tiere.

Zur Bekämpfung der Paratuberkulose der Schafe auf Island hat Sigurdsson die allergische Probe mit Geflügeltuberkulin in großem Umfang durchgeführt. Vergleichsuntersuchungen mit Johnin ergaben keine großen Unterschiede der Ergebnisse. Da verhältnismäßig viele unspezifische Reaktionen auftreten und die Tiere nur im mittleren Krankheitsstadium allergisch reagieren, hält Sigurdsson zur Erkennung der Paratuberkulose die Komplementbindungsreaktion für sicherer als den Hauttest.

In den Niederlanden wird der Johnintest mit der Tuberkulinprobe kombiniert vorgenommen. Eine Hautdickenzunahme von 2 mm und darüber wird als positive Johninreaktion angesehen. V. d. Schaaf und Zantinga (1955) haben in den Jahren 1950/1954 176 Bestände geprüft und im Durchschnitt 16 % positiv reagierende Tiere in den einzelnen Beständen ermittelt, von denen zwei Drittel älter als zwei Jahre waren. 163 im Johnintest reagierende Tiere wurden nach der Schlachtung untersucht und nur 60 % der Reagenten erwiesen sich als paratuberkuloseerkrankt. Von 118 Rindern mit positivem Sektionsbefund hatten 20 % eine negative Johninreaktion gezeigt.

Auch Schaaf und Mitarbeiter (1956) weisen auf die Schwankungen in der Reaktionslage der Tiere hin und heben hervor, daß Rinder mit Geflügeltuberkulose und häufig auch solche mit Dermatitis nodosa stärker auf Paratuberkulin als auf Säugetiertuberkulin reagieren. Trotz ihrer Fehlermöglichkeiten messen sie der Paratuberkulinprobe bei der Anwendung in paratuberkuloseverseuchten Beständen große Bedeutung bei, wenngleich sie für eine erfolgreiche Bekämpfung die gemeinsame Anwendung aller diagnostischen Hilfsmittel und die Kenntnis der epidemiologischen Bestandslage als notwendig erachten. Vergleichende Untersuchungen mit bovinem, aviärem und Paratuberkulin wurden an 156 infizierten Tieren durchgeführt. Auf bovines Tuberkulin reagierten 30,1 % positiv und 18,0 % zweifelhaft, auf aviäres Tuberkulin und auf Paratuberkulin nahezu übereinstimmend 67 % positiv und 20 % zweifelhaft.

### 4. Serologische Diagnose

Zur Diagnose der Paratuberkulose wurden bisher die Agglutinationsreaktion, die Haemagglutinationsreaktion nach Middlebrook-Dubos und die Komplementbindungsreaktion angewandt.

**Die Agglutinationsmethode** wurde zuerst von Twort (1912) bei künstlich infizierten Tieren verschiedener Arten durchgeführt. Den diagnostischen Wert dieser Untersuchungsmethode bei Kälbern hielt er für gering, bei infizierten Kleintieren jedoch, besonders bei Vögeln, erzielte er bessere Ergebnisse. Auf Grund vergleichender Untersuchungen unter Verwendung verschiedener säurefester Bakterien als Antigen fand Twort die Agglutinationsreaktion für nicht spezifisch auf Paratuberkulose. Cilli (1933) hat Blutproben von infizierten Rindern mit Hilfe der Agglutinationsreaktion untersucht und lehnte sie schon wegen der technischen Schwierigkeiten ab. Er beobachtete häufig spontane Zusammenballungen der Bakterien besonders dann, wenn das Antigen keine vollkommen homogene Suspension mit feinster Verteilung der Bakterien darstellte.

**Die Haemagglutinationsreaktion** wurde zuerst von Gernez-Rieux und seinen Mitarbeitern (1950) an fünf Rindern, die klinisch an Paratuberkulose erkrankt waren und die Erreger im Kot ausschieden, durchgeführt. Sie stellten vier Antigene her, und zwar drei aus Tuberkelbakterien und eines aus M. phlei, von denen das letztere nur schwache Reaktionen gab, während die übrigen starke Reaktionen bewirkten. Aus ihren Untersuchungsergebnissen schließen die Autoren, daß die Haemagglutination unter Verwendung der angegebenen Antigene für die Paratuberkulose nicht spezifisch ist.
Fischer und Gregory (1951) erhielten bei der Untersuchung von Blutproben natürlich und künstlich mit Paratuberkelbakterien infizierter Rinder unter Verwendung eines Tuberkulose-Antigens positive Resultate. Larsen, Porten und Vardaman (1953) haben bei der Durchführung der Haemagglutinationsreaktion P. P. D.-Johnin zur Sensibilisierung der Hammel-Erythrozyten verwendet und fanden unter 67 Tieren aus einem verseuchten Bestand 25 positive heraus. Als positiv werteten sie einen Titer von 1 : 32 und höher. Die Untersucher konnten keine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Haemagglutinations- und der vergleichsweise angewendeten allergischen Reaktion feststellen.

**Die Komplementbindungsreaktion (KBR)** hat gegenüber den beiden angeführten serologischen Untersuchungsmethoden eine größere Bedeutung in der Diagnostik der Paratuberkulose erlangt.

Twort (1912) führte die KBR bei 31 künstlich infizierten Tieren, auch kleinen Versuchstieren, und 2 natürlich infizierten Rindern durch. Als

Antigen verwendete er eine mehrstündig geschüttelte Suspension von Paratuberkelbakterien, die nach dem Schütteln 1 Stunde im Wasserbad von 60° C erhitzt wurde; die Ausführung der Reaktion erfolgte nach der Wassermann'schen Technik. Positive Resultate erhielt der Verfasser nur bei einem spontan erkrankten Bullen, bei einer künstlich infizierten Kuh, die aber gleichzeitig mit Tuberkulose behaftet war, und bei infizierten Kaninchen. Schwache Reaktionen traten bei einem Kalb sowie bei zwei Ziegen und Schafen 6 Monate nach der subkutanen bzw. intravenösen Infektion auf. Twort fand, daß die KBR nur eine geringe Spezifität besitzt und daß im vorgeschrittenen Krankheitsstadium das Bindungsvermögen der Seren nachläßt.

Bang und Andersen (1913) sind jedoch entgegengesetzter Ansicht. Bei ihren Untersuchungen konnten sie feststellen, daß mit fortschreitender Ausbreitung der Erkrankung die Sicherheit der Reaktion steigt. Die KBR wurde mit ganzen Dosen durchgeführt und im hämolytischen System eine 2 %ige Aufschwemmung von Ziegenblutkörperchen verwendet. Als Antigen diente, nachdem sich Tuberkulin als unbrauchbar erwiesen hatte, eine Emulsion von Tuberkelbakterien. Diese wurden in Bouillon gezüchtet, mit der Nährflüssigkeit gekocht, abfiltriert und zur Entfernung von Fremdbestandteilen mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen. Nachdem die gewaschenen Bakterien mit Fließpapier abgedrückt worden waren, erfolgte die Aufnahme von 3 g in 1000 ccm Wasser. Diese Suspension stellte das gebrauchsfertige Antigen dar. Die Versuchsansteller mußten im Verlauf ihrer Arbeit die Erfahrung machen, daß sich die Antigene häufig hemmend auf die Hämolyse auswirkten, aber sie konnten in einigen Fällen diese Eigenhemmung der Antigene durch einen hohen Hämolysintiter überwinden. Zur Herstellung des Antigens müssen gut emulgierbare Bakterien verwendet werden, um eine haltbare Emulsion zu erzielen. Die KBR stellt nach Ansicht der Autoren nur eine spezifische Gruppenreaktion der säurefesten Bakterien dar, was auch später von anderen Untersuchern betont wird.
Bang und Andersen haben insgesamt 800 Tiere aus tuberkulosefreien Beständen, in denen seit längerer Zeit die Paratuberkulose herrschte, in der KBR untersucht. Sämtliche Rinder wurden vorher der allergischen Probe mit Geflügeltuberkulin unterzogen. In der Gruppe der auf Geflügeltuberkulin ansprechenden Tiere reagierten 36,8—55,6 % positiv und unter den nicht auf Geflügeltuberkulin reagierenden Tieren wurden 9,5—13 % positive Reagenten festgestellt. Nur einzelne Tiere konnten nach der Schlachtung überprüft werden, wobei sich 4 Rinder der negativen Gruppe als mit Paratuberkulose infiziert erwiesen.
In Fortführung der Versuche wurden mit verschiedenen Antigenen 25 Seren von Kühen, die auf Geflügeltuberkulin ansprachen, vergleichend untersucht. Die Wirkungsbreite der Antigene war, wie die folgende Auf-

stellung zeigt, unterschiedlich:

| | |
|---|---|
| a) Emulsion eines von Papageien herausgezüchteten Tuberkelbakterienstammes | 52 % positiv |
| b) Emulsion von Paratuberkelbakterien | 28 % positiv |
| c) Emulsion aus Geflügeltuberkelbakterien | 24 % positiv |

Das von Besredka (1914) entwickelte Tuberkuloseantigen, das eine Emulsion von jungen, abgetöteten, auf einem lipoidhaltigen Nährboden gewachsenen Tuberkelbakterien in Kochsalzlösung darstellt, hat Cilli (1933) zur Diagnose der Paratuberkulose verwendet. Von 10 natürlich infizierten Tieren reagierten 9 in der KBR positiv, aber bei 5 Tieren, die nur geringe Schleimhautveränderungen nach der Schlachtung aufwiesen, versagte die Reaktion. Künstlich mit Paratuberkelbakterien infizierte Rinder gaben zu 66,64 % eine positive Komplementbindung, während bei Rindern, die mit M. phlei infiziert worden waren, zweifelhafte und negative Resultate erzielt wurden. Der Verfasser hält die KBR in Verbindung mit der intrakutanen Paratuberkulinprobe für geeignet zur Erkennung der Paratuberkulose.

Hagan und Zeissig (1933) haben Untersuchungen an natürlich und künstlich infizierten Rindern mit der KBR unter Verwendung verschiedener Antigene durchgeführt. In der Hauptsache verwendeten sie ein nach den Angaben von Witebsky, Klingenstein und Kuhn hergestelltes Antigen, daneben ein solches aus teilweise entfetteten Tuberkelbakterien. Auf Grund ihrer vergleichenden serologischen Untersuchungen kommen sie zu dem Schluß, daß die von ihnen durchgeführte KBR nicht für die Johne'sche Krankheit spezifisch ist, sondern gruppenspezifisch, da auch Tiere reagierten, die mit M. tuberculosis var. hominis, M. tuberculosis var. bovis bzw. M. avium infiziert waren. Auch unspezifische Reaktionen kamen vor. Bei Anwendung des Hauttestes und der KBR erzielten Hagan und Zeissig nur in etwa 60 % der Fälle Übereinstimmung.
Die Herstellung des Antigens nach Witebsky, Klingenstein und Kuhn (1931) wird folgendermaßen vorgenommen: Getrocknete Tuberkelbakterien werden in Alkohol gründlich gekocht, abfiltriert und der Rückstand mit heißem Pyridin extrahiert. Die nach dem Eindampfen des Pyridinauszuges entstehende zähe Masse wird mit Azeton extrahiert, der Rückstand der Azetonextraktion in Benzol aufgenommen und mit einer stets zu bestimmenden Menge einer 1 %igen alkoholischen Lezithinlösung versetzt. Zusätze von Lezithin oder Cholesterin erhöhen die Wirksamkeit der Antigene, die Spezifität der Extrakte kann jedoch nach den Untersuchungen von Schloßberger und Mitarbeiter (1929) durch solche Sensibilisatoren beeinträchtigt werden. Auch im Besredka-Antigen

wirkt nach Meller (1927) das Lezithin als Bestandteil des Eidotternährbodens, der zur Züchtung der verwendeten Bakterien dient, verstärkend.

Versuche geringen Umfanges führte Nag (1938) mittels der KBR durch, und zwar bei Tieren, die auf ein von ihm hergestelltes Paratuberkulin positiv reagierten. Für einige seiner Untersuchungen verwendete er ein Antigen der I. G. Farben A.-G., später stellte er sich selbst ein Paratuberkulose-Antigen her. Nag trocknete Bakterien von Sauton'schen Nährböden im Exsiccator, gab sie für 14 Tage in eine Kugelmühle zum Zerreiben und suspendierte das Pulver in Wasser. Dann erhitzte er die Suspension auf 65° C für die Dauer von 30 Minuten, ließ die groben Bestandteile sedimentieren und verwendete die überstehende Flüssigkeit als Antigen. Bei der Untersuchung von 28 auf Paratuberkulin reagierenden Tieren ergab die KBR in 20 Fällen (71,43 %) ein positives Ergebnis.

Bei der Anwendung eines Methylalkoholextraktes von M. paratuberculosis in der Komplementbindungsreaktion hat Prokhorav (1940) in etwa 80 % der Fälle Übereinstimmung der Ergebnisse mit dem Zerlegungsbefund erhalten. Bei künstlich infizierten Kälbern fiel die KBR schon 22 bis 86 Tage nach der Infektion positiv aus.

Sigurdsson, Vigfusson und Theodors (1945) haben mit gutem Erfolg die KBR bei der Johne'schen Krankheit der Schafe auf Island angewendet. 97 % der untersuchten infizierten Schafe (Kontrolle durch die Schlachtung) reagierten serologisch positiv, während nur ca. 50 % auf die allergische Probe ansprachen. Von den 34 Reagenten konnten nur bei 4 Tieren keine für Paratuberkulose sprechenden pathologisch-anatomischen Veränderungen nach der Schlachtung festgestellt werden.
Sigurdsson und Mitarbeiter verwendeten als Antigen einen wässerigen Gewebeextrakt aus Teilen der Darmschleimhaut erkrankter Tiere. Die zu untersuchenden Schafseren wurden zu gleichen Teilen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und 30 Minuten bei 62,5° C inaktiviert. Dies geschah, um das nach der Inaktivierung bei 50—60° C häufig auftretende antikomplementäre Verhalten der Seren zu vermeiden. Der im hämolytischen System gebrauchte Ambozeptor wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit zerkleinerten Meerschweinchennieren gewonnen. Durch diese Maßnahme soll die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung zwischen dem Antigen (Gewebeextrakt vom Schaf) und einem Ambozeptor, der Antikörper gegen Schafblutkörperchenstroma enthält, ausgeschlossen werden. Die Versuchsansteller haben mit ihrem Antigen auch eine Anzahl von tuberkulösen und leprösen Seren von Menschen geprüft und dabei positive Resultate erhalten. Sie schließen daraus, daß das Antigen nicht spezifisch, sondern nur gruppenspezifisch arbeitet.

Da aber die Tuberkulose bei Haustieren in Island keine praktische Bedeutung hat, ist nach Sigurdsson (1956) die KBR als diagnostische Methode bei der Bekämpfung der Paratuberkulose gut geeignet. Sie fällt in einem früheren Stadium der Erkrankung positiv aus als der Hauttest und bleibt auch im anergischen Zustand der erkrankten Tiere positiv.

Eine weitgehende Abänderung der Standardmethode der KBR hat Hole (1952) für die Diagnose der Paratuberkulose ausgearbeitet. Entgegengesetzt der bisherigen Ansicht, daß sich Antikörper und Antigen nur in Gegenwart von Komplement binden können, findet nach Hole eine Vereinigung beider auch leicht in Abwesenheit des Komplements statt. So werden nach seiner Technik zunächst nur Antigen und Serum gemischt und für eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach dieser Einwirkungszeit, in der sich Antigen und Antikörper vereinigen, wird die Mischung zentrifugiert, die überstehende Serumverdünnung abgegossen und die sedimentierten Bakterien des Antigens in Kochsalzlösung aufgenommen. Dieser Suspension wird dann Komplement zugesetzt, das von dem vereinigten Antigen-Antikörper-Komplex absorbiert wird. Durch nicht sensibilisiertes Antigen, d. h., wenn keine Antikörper im Serum vorhanden waren, tritt eine derartige Wirkung nicht ein, so daß das Komplement dann für das zugesetzte hämolytische System frei bleibt. Hole vermeidet durch seine modifizierte Technik, daß Serum und Komplement miteinander in Berührung kommen und verhindert auf diese Weise die von ihm häufig beobachtete antikomplementäre Wirkung von Rinderseren.
Von überlegener Wirksamkeit hat sich ein Antigen erwiesen, das eine Suspension von gewaschenen Paratuberkelbakterien in Kochsalzlösung darstellte. Vergleichende Untersuchungen mit einem Antigen aus Geflügeltuberkelbakterien haben zwar in einem hohen Prozentsatz der Untersuchungen eine Übereinstimmung der Ergebnisse ergeben, aber das Antigen aus Paratuberkelbakterien erscheint dem Autor geeigneter für die Untersuchungen zu sein. Die KBR wurde bis 1954 in etwa 50 000 Fällen angewendet und bei einer Anzahl ausgewählter Tiere durch die Schlachtung überprüft. Hole erzielte bei 90 % der untersuchten Tiere. die sich nach der Schlachtung als infiziert erwiesen, positive Ergebnisse in der KBR, während bei 23 % der Reagenten ein negativer Sektionsbefund erhoben wurde.
Die beschriebene Modifikation der KBR wird für die zuverlässigste Methode der Diagnose intra vitam angesehen.

Der diagnostische Wert der KBR wurde von Krause (1954) und Rosenberger und Krause (1955) an 334 Rindern geprüft. Die Untersuchungen wurden nach der von Hole beschriebenen Technik unter Verwendung eines ebenfalls von Hole zur Verfügung gestellten Antigens

durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurden bei 131 Rindern aus paratuberkulose- und tuberkulosefreien Beständen 8,4 % positive und zweifelhafte Reaktionen erzielt, von 101 tuberkuloseinfizierten, aber paratuberkulosefreien Tieren reagierten 54,5 % und von 8 klinisch paratuberkuloseverdächtigen Rindern, die auf die allergische Probe nicht ansprachen, fiel die KBR 7 mal positiv aus. Ein anderer Bestand wurde 10 Monate nach der Schutzimpfung mit einer Paratuberkulose-Lebendkultur nach Vallée und Rinjard serologisch geprüft. Von den Tieren, die vor der Impfung tuberkulinpositiv reagierten, gaben 76,6 % und von den Rindern, die vor der Impfung tuberkulinnegativ waren, 52,6 % ein positives Resultat in der KBR.
Krause und Rosenberger kommen zu dem Ergebnis, daß die KBR ein brauchbares diagnostisches Hilfsmittel zur Feststellung der Paratuberkulose darstellt, aber nur dann, wenn sie in tuberkulosefreien Beständen zur Durchführung gelangt.

Auf Grund der günstigen Berichte von Hole über die KBR zur Sicherung der Diagnose der Paratuberkulose des Rindes wurde auch in den Niederlanden von v. d. Schaaf und Zantinga (1955) und v. d. Schaaf (1956) versucht, die KBR zur Erkennung und Bekämpfung der Paratuberkulose heranzuziehen. Die Durchführung der Reaktion erfolgt mit geringen Abänderungen nach der auch für die Brucellosediagnostik üblichen Technik. Als Antigen dient eine wässerige Suspension von Paratuberkelbakterien, die auf dem Dunkin'schen Nährboden gezüchtet, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, gewaschen und im Schüttelapparat einige Stunden mit Glasperlen geschüttelt werden. Die so erhaltene Suspension wird eine Stunde lang auf 60° C erhitzt und im Nephelometer auf 60 Einheiten eingestellt.
v. d. Schaaf hat eine Anzahl von Untersuchungen mit gutem Erfolg durchgeführt. Von 531 klinisch verdächtigen Tieren, deren Blutproben von praktischen Tierärzten eingesandt wurden, fiel die KBR zu 47 % positiv und zu 11 % zweifelhaft aus. — Die Blutproben von 179 tuberkulosefreien Rindern, die sich nach der Schlachtung als paratuberkuloseinfiziert erwiesen, wobei die Prüfung nur makroskopisch und bakterioskopisch, nicht histologisch oder kulturell vorgenommen wurde, gaben in 80 % eine positive und in 9 % eine zweifelhafte Reaktion. 5 % dieser Rinder, die nur geringgradige pathologisch-anatomische Veränderungen aufwiesen, reagierten serologisch negativ. Bei diesen 179 Tieren konnte durch die Kotuntersuchung nur in 27 % der Fälle ein positiver und in 13 % ein zweifelhafter Befund erhoben werden. — Ferner wurden 651 Rinder aus verseuchten Beständen, die im Johnintest positiv reagiert hatten, untersucht. Die KBR stimmte nur in 14 % eindeutig überein, in 15 % der Fälle war das Ergebnis zweifelhaft. — Von 64 Rindern, die auf Johnin oder Tuberkulin ansprachen und aus diesem Grunde geschlachtet

wurden, aber nach der Schlachtung frei von Paratuberkulose waren, gaben 12 ein positives und 9 ein zweifelhaftes Resultat in der KBR. — In einem weiteren Versuch hat v. d. Schaaf 43 Rinder, die mit seinem im Herbst 1954 neu hergestellten Johnin getestet wurden und positive Hautreaktionen aufwiesen, vergleichsweise in der KBR geprüft. Davon waren

19 in der KBR positiv und nach der Schlachtung positiv,

7 in der KBR zweifelhaft, davon 5 nach der Schlachtung positiv,

17 in der KBR negativ, davon 11 nach der Schlachtung negativ.

v. d. Schaaf kommt, wie alle Wissenschaftler, die sich mit diesem Problem beschäftigt haben, zu dem Schluß, daß die von ihm angewendete KBR nicht spezifisch ist, sondern auch bei einer Infektion mit anderen säurefesten Mycobakterien, z. B. bei der Skin lesions, positiv ausfallen kann. In diesem Zusammenhang prüfte er 51 Tiere mit Skin lesions, die alle im Johnintest positiv waren, und erhielt in der KBR 3 positive, 9 zweifelhafte und 38 negative Resultate. Trotz dieser Nachteile erblicken die Verfasser in der KBR, sofern diese sinnvoll und kontrolliert angewendet wird, eine brauchbare diagnostische Methode, deren positiver Ausfall kombiniert mit dem positiven Johnintest mit großer Sicherheit eine Erkrankung des Tieres anzeigt.

Auch Schaaf und Mitarbeiter (1956) messen der KBR zur Erkennung klinischer und auch subklinischer Fälle von Paratuberkulose eine große Bedeutung bei, halten es aber für notwendig, die Paratuberkulinprobe als ergänzende diagnostische Untersuchung gleichzeitig durchzuführen. Leider geht aus der Arbeit nicht hervor, nach welcher Technik und mit welchem Antigen die Untersuchungen durchgeführt worden sind. Die Untersuchungsbefunde erstreckten sich auf 63 geschlachtete paratuberkulöse Rinder, von denen sich vor der Schlachtung 40 im klinischen und 23 im subklinischen Stadium befanden. Von den 40 klinischen Fällen waren in 39 in der KBR positiv, während die 23 subklinischen Fälle ausnahmslos positiv reagierten.

## Eigene Untersuchungen.

### A) Methodik und Material

Die eigenen Untersuchungen wurden im wesentlichen nach der von v. d. Schaaf und Zantinga (1955) angegebenen Technik durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, weil sie sich im Vergleich mit der von Hole beschriebenen modifizierten KBR als geeigneter erwies. Ich habe beide Methoden unter Verwendung eines von Herrn Professor v. d. Schaaf zur Verfügung gestellten Antigens an 30 Blutproben von Rindern aus einem seit Jahren verseuchten Bestand sowie an bekannten positiven und negativen Seren vergleichend untersucht (Tabelle 1). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, daß die in Utrecht ausgearbeitete Methode stärkere Reaktionen ergab. Inwieweit diese Unterschiede darauf zurückzuführen sind, daß das verwendete Antigen nicht auf die modifizierte Technik von Hole eingestellt war, läßt sich allerdings nicht entscheiden, da ein derartiges Antigen für den Vergleich nicht zur Verfügung stand.

## Tabelle 1

| | Serum-kont. | Methode nach Hole Antigen Utrecht I. | | | | Methode nach v. d. Schaaf Antigen Utrecht I. | | | | Antigen-kontr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 : 5 | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 40 | 1 : 5 | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 40 | |
| 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 3 | — | 3 | 2 | — | — | 4 | 4 | 3 | 1 | + |
| 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 5 | — | 3 | 2 | — | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + |
| 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 10 | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | + |
| 11 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 12 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 13 | — | 2 | 1 | — | — | 4 | 4 | — | — | + |
| 14 | — | 4 | 3 | 1 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 15 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 16 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 17 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 18 | — | — | — | — | — | 1 | 1 | — | — | + |
| 19 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 21 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 22 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 23 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 24 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 25 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 26 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 27 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 28 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 29 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 30 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| pos. 994 | — | 4 | 2 | 1 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + |
| pos. 520 | — | 4 | 3 | 2 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| pos. 521 | — | 4 | 2 | 1 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| pos. 1011 | — | 1 | — | — | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| neg S. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| neg. S. | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |

## 1. Vorbereitung der einzelnen Komponenten für die KBR

a) Seren:

Die zu untersuchenden Blutproben kamen in üblichen Blutröhrchen an das Tierhygienische Institut, München zur Einsendung. Das bereits abgesetzte Serum wurde in Zentrifugenröhrchen abgegossen, 15 Minuten lang bei 3000 U/Min. zentrifugiert und nach vollständiger Klärung in sterile Reagenzgläser umgefüllt. Darauf erfolgte das Inaktivieren der unverdünnten Seren für 30 Minuten im Wasserbad von 56° C. Bei leicht hämolytischen Seren hat es sich als zweckmäßig erwiesen, diese vor dem Inaktivieren im Verhältnis 1 : 5 mit physiologischer Kochsalzlösung zu verdünnen.

Die Seren für die diagnostischen Untersuchungen wurden nichtkonserviert im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Die positiven und negativen Standardseren wurden nach dem Inaktivieren mit der gleichen Menge einer 0,5 %igen Karbolkochsalzlösung versetzt und dann ebenfalls im Kühlschrank gehalten.

b) Komplement:

Als Komplement diente Serum von gesunden, ausgewachsenen Meerschweinchen. Die Tiere wurden entblutet, das Blut blieb in Zentrifugenröhrchen bis zur vollständigen Gerinnung bei Zimmertemperatur stehen und wurde dann zentrifugiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren des überstehenden Serums erfolgte die Konservierung nach Witte (1933) durch Zusatz einer gleichen Menge einer Lösung von 4 g Borsäure und 10 g Kaliumsulfat in 100 ccm Aqua dest.. Das konservierte Komplement wurde im Kühlschrank aufbewahrt und behielt nach einem geringen Titerabfall in den ersten Tagen über 2—3 Monate eine konstante Wertigkeit. Vor jeder Verwendung des Komplements wurde eine Bestimmung des Komplementtiters entsprechend dem zweiten Vorversuch (Tabelle 4) durchgeführt.

c) Antigen:

Aufgabe dieser Arbeit war es, Paratuberkuloseantigene herzustellen und zu prüfen. Da sich, nach dem Schrifttum zu urteilen, einfache Suspensionen von M. paratuberculosis und wässerige Extrakte den chemischen Extraktionsprodukten überlegen gezeigt hatten, wurden auch in den eigenen Versuchen derartige Antigene hergestellt. Die einzelnen Antigene und die genaue Herstellungsweise werden später in dem entsprechenden Abschnitt beschrieben. Um die gewonnenen Stammantigene in die notwendige Verdünnung für den Gebrauch in der KBR bringen zu können, muß jeweils eine genaue Antigenauswertung vorgenommen werden.

Die Auswertung erfolgte an zwei stark positiven, einem schwach positiven und zwei negativen Seren sowie an einer Kochsalzreihe. Von jedem

Serum wurden die Verdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 mit der verschiedenen Antigenabstufungen und zwar 1 : 10, 1: 20 bis 1 : 100 geprüft. Zum Vergleich wurde ein bekanntes Antigen in der Gebrauchskonzentration gleichlaufend für alle Seren und Serumverdünnungen angesetzt, außerdem für jede Serumverdünnung eine Serumkontrolle ohne Antigen, um die verwendeten Seren auf eine eventuell vorhandene eigenhemmende Wirkung zu prüfen. Die negativen Seren und zusätzlich die Kochsalzreihe dienten zur Feststellung eigenhemmender Eigenschaften des Antigens.

Es waren also für jede Antigenauswertung 21 Reihen mit je 12 Röhrchen notwendig. In der Tabelle 2 ist die Versuchsanordnung für ein positives Serum zusammengestellt, die in gleicher Weise für die vier übrigen Seren gilt. Nach dem aufgezeigten Schema wurde die Reaktion dann in der für die KBR üblichen Weise durchgeführt. Der Antigenauswertung ging stets eine Komplementauswertung voraus.

Die optimale Antigenverdünnung war diejenige, die mit den höchsten Verdünnungen der positiven Seren noch eine Hemmung der Hämolyse ergab. Als Gebrauchstiter des Antigens wurde bei der Anwendung in der KBR dann die nächst niedere Verdünnung verwendet.

**Tabelle 2**

3. Vorversuch: Antigenauswertung.

| | Antigenverdünnungen | | | | | | | | | | Bekanntes Antigen Gebrauchs-Konzentr. | Serum-Kontr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:20 | 1:30 | 1:40 | 1:50 | 1:60 | 1:70 | 1:80 | 1:90 | 1:100 | | |
| **1. Reihe** Serumverdünnung 1 : 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | VA | SK |
| **2. Reihe** Serumverdünnung 1 : 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | VA | SK |
| **3. Reihe** Serumverdünnung 1 : 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | VA | SK |
| **4. Reihe** Serumverdünnung 1 : 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | VA | SK |
| **5. Reihe** NaCl | AK | AK | AK | AK | AK | AK | AK | AK | AK | AK | VA | — |
| | 45 Minuten Wasserbad von 37° C | | | | | | | | | | | |
| | Zusatz des hämolytischen Systems, 1,0 ccm in jedes Röhrchen | | | | | | | | | | | |
| | 30 Minuten Wasserbad von 37° C | | | | | | | | | | | |

Ablesung der Reaktionen

Es bedeuten:

0 = 0,5 ccm Antigenverdünnung
0,5 ccm Serumverdünnung
0,5 ccm Komplement-Gebrauchsdosis

AK = 0,5 ccm Antigenverdünnung
0,5 ccm NaCl-Lösung
0,5 ccm Komplement-Gebrauchsdosis

VA = 0,5 ccm Vergleichsantigen in Gebrauchskonz.
0,5 ccm Serumverdünnung
0,5 ccm Komplement-Gebrauchsdosis

SK = 0,5 ccm Serumverdünnung
0,5 ccm Komplement-Gebrauchsdosis
0,5 ccm NaCl-Lösung

d) Hämolytischer Ambozeptor:

Der hämolytische Ambozeptor, der ein Antischafblutkörperchenserum vom Pferd darstellte, wurde von den Behringwerken in Marburg (Lahn) bezogen. Für die verschiedenen Lieferungen waren die Titer 1 : 4000 bzw. 1 : 6000 von der Herstellerfirma angegeben worden. Vor der Verwendung eines neuen Ambozeptors wurde jeweils eine Austitrierung vorgenommen, deren Ergebnis in allen Fällen mit dem angegebenen Titer übereingestimmt hat. Als Gebrauchskonzentration fand die 4 fach lösende Dosis des ermittelten Titers Verwendung. In der Tabelle 3 ist eine Ambozeptorauswertung dargestellt. In diesem Fall beträgt der Titer des hämolytischen Ambozeptors 1 : 4000, die verwendete Gebrauchskonzentration ist dann die Verdünnung 1 : 1000.

**Tabelle 3**

1. Vorversuch: Ambozeptorauswertung.

| Röhrchen-Nr. | Hämolytischer Ambozeptor | | physiol. NaCl-Lösung | Komplement 1 : 10 | Hammelblutkörperchen 1 : 20 | | Hämolyse |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Verdünnung | Menge | | | | | |
| 1 | 1 : 100 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 20 Minuten im Wasserbad bei 37° C | + |
| 2 | 1 : 500 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | + |
| 3 | 1 : 1000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | + |
| 4 | 1 : 2000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | + |
| 5 | 1 : 3000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | + |
| 6 | 1 : 4000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | + |
| 7 | 1 : 6000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | — |
| 8 | 1 : 8000 | 0,5 ccm | 1,0 ccm | 0.5 ccm | 0,5 ccm | | — |
| Kontrollen: | | | | | | | |
| Ambozeptor-Kontrolle 9 | 1 : 100 | 0,5 ccm | 1,5 ccm | — | 0,5 ccm | | — |
| Komplement-Kontrolle 10 | | — | 1,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | | — |
| Hammelblutkörp.-Kontrolle 11 | | — | 2,0 ccm | — | 0,5 ccm | | — |

e) Schafblutkörperchen:

Die Blutentnahme erfolgte einmal wöchentlich unter sterilen Bedingungen aus der V. jugularis eines Schafes. Nach dem Defibrinieren des Blutes durch Schütteln mit Glasperlen wurde es durch Mull filtriert und 15 Minuten lang bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde abgehebert, durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt und die Blutaufschwemmung wiederum zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die überstehende Flüssigkeit farblos war. Der Blutkörperchenbodensatz, der nach dem Abhebern des letzten, farblosen Überstandes verblieb, diente zur Herstellung der 3%igen Erythrozytenaufschwemmung für das hämolytische System.

f) Hämolytisches System:

Das hämolytische System wurde vor jeder Untersuchung frisch bereitet. Es bestand aus gleichen Teilen der Gebrauchskonzentration des hämolytischen Ambozeptors und der 3 %igen Aufschwemmung von Schafblutkörperchen. Die beiden Verdünnungen wurden getrennt hergestellt, dann zusammengegossen und gut durchgemischt.

**2. Durchführung der Reaktion**

a) Komplementauswertung:

Vor der Durchführung einer Antigenauswertung oder eines Hauptversuches wurde jeweils der Komplement-Vorversuch mit abgestuften Komplementmengen angesetzt, um den kleinsten Wert zu bestimmen, der eine komplette Hämolyse der im hämolytischen System enthaltenen Schafblutkörperchen hervorruft. Die Ausführung der Komplementauswertung (Tabelle 4) erfolgte als kombinierter Komplement-Vorversuch in mindestens 4 Reihen mit je 6 Röhrchen, und zwar in folgender Anordnung:

1. System-Reihe — In ihr wirken die Komplementverdünnungen nur auf das hämolytische System ein.

2. Antigen-Reihe — Die Komplementverdünnungen werden jeweils mit der Gebrauchskonzentration des Antigens zusammengegeben. In dieser Reihe kann eine eigenhemmende Wirkung des Antigens ermittelt werden.

3. Hauptreihe — In dieser Reihe werden die Komplementverdünnungen im Zusammenwirken mit Normalserum und Antigen geprüft.

4. Serum-Reihe — Die Prüfung der Komplementverdünnungen mit den zu untersuchenden Seren hat sich als zweckmäßig erwiesen, um einen unterschiedlichen Komplementverbrauch der Seren berücksichtigen zu können.

Die weitere Durchführung der Reaktion erfolgte dann entsprechend der des Hauptversuches.

Durch diesen Vorversuch wurde die minimalste Komplementdosis (M. C. D.) ermittelt, die noch eine vollständige Hämolyse verursacht. Als Gebrauchskonzentration des Komplements fand dann das 1½ fache dieser Komplementmenge Verwendung. War der lösende Komplementtiter (= 1 M. C. D.) zum Beispiel 0,1 ccm Komplement 1 : 10 (2 %), also 0,01 ccm reines Komplement je Röhrchen, so kamen im Hauptversuch 1½ M. C. D. = 0,015 ccm reines Komplement, das in 0,5 ccm enthalten sein mußte, zur Anwendung. Das Verhältnis von 0,015 ccm Komplement zu 0,5 ccm Kochsalzlösung entspricht einer 3 %igen Verdünnung.

In der Tabelle 4 ist das Schema einer Komplementauswertung dargestellt.

**Tabelle 4**

2. Vorversuch: Komplementauswertung.

(Zahlenangaben in ccm)

| Röhrchen-Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. Reihe | | | | | | |
| Komplement 1 : 10 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| NaCl | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| NaCl | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 2. Reihe | | | | | | |
| Komplement 1 : 10 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| NaCl | 0,1 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| NaCl | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Antigen-Gebrauchskonzentration | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 3. Reihe | | | | | | |
| Komplement 1 : 10 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| NaCl | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| negatives Serum 1 : 5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Antigen-Gebrauchskonzentration | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 4. Reihe | | | | | | |
| Komplement 1 : 10 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| NaCl | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| fragliches Serum 1 : 5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| NaCl | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

45 Minuten Wasserbad von 37° C

Zusatz des hämolytischen Systems, in jedes Röhrchen 1,0 ccm

30 Minuten Wasserbad von 37° C

Ablesung der Reaktionen

b) Hauptversuch:

Die Versuchsanordnung für den Hauptversuch ergibt sich aus dem Schema in der Tabelle 5. Es wurde, wie auch in den Vorversuchen, mit ½ Dosen gearbeitet unter Verwendung eines bekannten positiven und negativen Serums. Zur Untersuchung kamen die Serumverdünnungen 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40. Für jedes Serum wurde eine Serumkontrolle ohne Antigen zur Prüfung auf etwaige eigenhemmende Eigenschaften des Serums angesetzt sowie eine Antigenkontrolle ohne Komplement, um lytische Eigenschaften des Antigens festzustellen. Eine zweite Antigenkontrolle ohne Serum aber mit Komplement zur Feststellung einer hemmenden Wirkung des Antigens wurde jeder Untersuchungsreihe einmal angeschlossen. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Röhrchen 2 Minuten bei 1000 U/Min. zentrifugiert und das Ergebnis abgelesen.

**Tabelle 5**

Hauptversuch
(Zahlenangaben in ccm)

| | 1. Röhrchen | 2. Röhrchen | 3. Röhrchen | 4. Röhrchen | Serum-kontrolle | Antigen-kontrollen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Serum | 0,5 (1 : 5 verdünnt) | 0,5 (1 : 10 verdünnt) | 0,5 (1 : 20 verdünnt) | 0,5 (1 : 40 verdünnt) | 0,5 (1 : 5 verdünnt) | 0,5 (1 : 5 verdünnt) | — |
| Antigen-Gebrauchskonzentration | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | — | 0,5 | 0,5 |
| Komplement-Gebrauchsdosis | 0,5 | 0.5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | — | 0,5 |
| NaCl | — | — | — | — | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| | 45 Minuten Wasserbad von 37° C | | | | | | |
| Hämolytisches System | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

30 Minuten Wasserbad von 37° C

2 Minuten bei 1000 U/Min. zentrifugieren

Ablesung der Reaktionen

**Bewertung des Reaktionsausfalls:**

++++ (4) = vollständige Hemmung der Hämolyse, scharf abgegrenzter roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit wasserklar.

+++ (3) = starke Hemmung der Hämolyse, deutlicher roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit rosa.

++ (2) = etwa 50 %ige Hemmung der Hämolyse, geringerer roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit kräftig rosa.

+ (1) = etwa 25 %ige Hemmung der Hämolyse, geringer roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit rot.

± = fast vollständige Hämolyse, kleiner, etwa stecknadelkopfgroßer roter Bodensatz, überstehende Flüssigkeit rot.

— = vollständige Hämolyse, kein Blutkörperchenbodensatz, überstehende Flüssigkeit rot, klar und lackfarben.

**Beurteilung der Ergebnisse der Komplementbindungsreaktion für Paratuberkulose:**

| | | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/40 |
|---|---|---|---|---|---|
| positiv | | ++++ | +++ | ++ | und darüber |
| schwach positiv | | ++++ | ++ | + | |
| | bis | ++++ | +++ | + | |
| zweifelhaft | | ++ | + | — | |
| | bis | +++ | +++ | + | |
| negativ | | ++ | — | — | und darunter |

### 3. Antigenherstellung

Für die Herstellung und den Vergleich der Antigene standen 10 verschiedene Stämme von Paratuberkelbakterien zur Verfügung. Die Herkunft dieser sich in der Sammlung des Tierhygienischen Instituts der Universität München befindlichen Stämme war nicht in allen Fällen bekannt; meist handelte es sich um aus Rinderorganen herausgezüchtete ältere Laboratoriumskulturen. Pigmentbildende Stämme befanden sich nicht darunter.

Die Bezeichnung der verwendeten Stämme war folgende:

1. Paratuberkulose (P) II
2. Paratuberkulose (P) III
3. Paratuberkulose (P) IV
4. Paratuberkulose (P) V
5. Strain 18
6. C 286
7. C 300
8. C Hull
9. 3384
10. 3390

Außer diesen Paratuberkulosestämmen wurden noch Mycobacterium avium Stamm 57 und Mycobacterium phlei zu den vergleichenden Untersuchungen mit herangezogen.

Die **Züchtung** der genannten Stämme erfolgte auf dem nach Reed modifizierten Sauton'schen Nährboden.

**Zusammensetzung des Reed'schen Mediums:**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Asparagin | | 5,0 | g |
| $KH_2$ $PO_4$ (monobasisches Kalium) | | 2,0 | g |
| Magnesiumsulfat | | 1,0 | g |
| Ammoniumcitrat | | 2,0 | g |
| Na Cl | | 2,0 | g |
| Ferriammoniumcitrat | | 0,075 | g |
| Dextrose | | 10,0 | g |
| Glycerin | | 60,0 | ccm |
| Aqua dest. | ad | 1000,0 | ccm |

$P_H$ auf 5,6 einstellen mit Ammoniumhydroxyd, d. h. einer Lösung von 35 %igem $NH_3$ in Aqua dest.

**Herstellungsweise:**

Das Asparagin wird unter Erwärmen in etwas Aqua dest. gelöst, und getrennt von diesem werden die übrigen Chemikalien mit Ausnahme von Ferriammoniumcitrat einzeln in wenig Aqua dest. aufgelöst. In der Reihenfolge des Rezeptes werden die Lösungen und das Ferriammoniumcitrat sowie zum Schluß das Glycerin dem angewärmten Asparagin hinzugefügt. Das Ganze wird bis zum Kochen erhitzt und nach dem Erkalten der $P_H$-Wert auf 5,6 eingestellt. Die Lösung wird dann filtriert, in geeignete Kölbchen abgefüllt und für 7 Minuten bei 1 Atü im Autoklaven sterilisiert.

Neben dem flüssigen Nährmedium wurden die Paratuberkulosekulturen auch auf festen Nährböden weitergezüchtet. Der Eiernährboden nach Gottsacker hat sich dazu als am besten geeignet erwiesen.

**Vergleichsantigene**

Da zu Beginn der eigenen Untersuchungen noch kein selbsthergestelltes Antigen zur Verfügung stand, wurden dankenswerterweise von Herrn Professor Dr. v. d. Schaaf, Utrecht, zwei Antigenproben und eine solche von einem anderen Institut, das im Verlauf der Versuche mit „A" bezeichnet wurde, zur Verfügung gestellt.

Obwohl die Anwendung dieser drei Antigene zeitlich nicht zusammenfiel, sollen ihre Beschaffenheit und Wirkungsweise im einzelnen vorweg beschrieben werden.

**Antigen „Utrecht I":**

Dieses Antigen stellte eine homogene, milchig aussehende Flüssigkeit dar, die nach längerem Stehen geringgradig sedimentierte. Als Gebrauchsdosis wurde in der Antigenauswertung die Verdünnung 1 : 30 ermittelt. In einer späteren Mitteilung gab Herr Professor v. d. Schaaf die Gebrauchsverdünnung 1 : 32 an.

**Antigen „Utrecht II":**

Dieses später erhaltene Antigen war wie das erste eine homogene, milchige Flüssigkeit mit geringem Bodensatz nach längerem Stehen. Sie wurde in der angegebenen Gebrauchsverdünnung 1 : 22 verwendet.

**Antigen „A":**

Das Antigen „A" war eine bräunlich gefärbte, krümelige Suspension von Bakterien, die schnell und vollständig sedimentierten, so daß sich schon nach kurzer Zeit über dem krümeligen Bodensatz eine nahezu wasserklare Flüssigkeit befand. Die Gebrauchsverdünnung war mit 1 : 30 angegeben.

Das Arbeiten mit diesem Antigen war nicht befriedigend; es ergaben sich schon beim Reaktionsansatz Schwierigkeiten, da wegen der sehr schnellen Sedimentierung, die schon in der Pipette eintrat, eine einheitliche und genaue Mischung und Dosierung nicht möglich war. Auf Grund der gemachten Erfahrungen bei der eigenen Antigenherstellung wurde versucht, eine günstigere Beschaffenheit dieses Antigens dadurch zu erreichen, daß 6 ccm der Originalsuspension 5 Minuten lang bei Stufe 10 homogenisiert wurden*). Es entstand eine dickflüssige, breiartige Substanz, die dann mit 3 ccm einer 0,5 %igen Karbolkochsalzlösung verdünnt und gleichmäßig gemischt wurde.

*) Homogenisator der Firma Gühler, Tübingen

Um dieses so bearbeitete Antigen auf eine eventuell eingetretene Änderung der antigenen Wirksamkeit zu prüfen, wurde eine erneute Antigenauswertung vorgenommen. Bei der dazu durchgeführten Komplementauswertung zeigte sich, daß der Komplementverbrauch des Antigens in den geringeren Verdünnungen sehr hoch war und allmählich mit zunehmender Verdünnung auf den Wert für Kochsalzlösung und Serum absank.
Die Antigenauswertung ergab die Gebrauchsverdünnung 1 : 30. Da das Originalantigen nach der Bearbeitung um 50 % verdünnt wurde, ist also durch das Homogenisieren die antigene Wirksamkeit der Bakteriensuspension um das Doppelte gesteigert worden.

Die eigene Antigenherstellung fand auf folgende Weise statt:

**a) Bearbeitung im Mörser**

Für die Herstellung der ersten Gruppe von Antigenen wurden 5 Paratuberkelbakterienstämme, und zwar P II, P III, P IV, P V, C 286 sowie M. phlei, verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten 6 Wochen alte Kulturen, die in dicker, höckeriger Schicht auf der Oberfläche des Reed'schen Mediums gewachsen waren.

Die Bakterien wurden von der Nährflüssigkeit abfiltriert und mehrmals mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um alle Nährbodenbestandteile zu entfernen. Der Bakterienrückstand wurde dann mit Fließpapier gut abgedrückt, gewogen, im Mörser kräftig zerrieben und schließlich mit einer 0,5 %igen Karbolkochsalzlösung zu einer gleichmäßigen Suspension aufgenommen. Um bei allen Stämmen ein entsprechendes Gewichtsverhältnis zu erhalten, wurde die Flüssigkeit so abgemessen, daß 1 g feuchte Bakterienmasse jeweils in 10 ccm einer 0,5 %igen Karbolkochsalzlösung aufgeschwemmt waren. Die auf diese Weise gewonnenen Antigene wurden für die Dauer von 1 Stunde im Wasserbad bei 60° C gehalten und dann nach der beschriebenen Technik ausgewertet.

**Tabelle 6**

Übersicht über die Ergebnisse der Antigenauswertungen der ersten Herstellungsgruppe

| | 1:10 | 1:20 | 1:30 | 1:40 | 1:50 | 1:60 | 1:70 | 1:80 | 1:90 | 1:100 | Gebr. Konz. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P II | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0 |
| P III | + | + | + | + | — | — | — | — | — | — | 1:40 |
| P IV | + | + | + | — | — | — | — | — | — | — | 1:30 |
| P V | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | 1:80 |
| C 286 | + | + | + | + | — | — | — | — | — | — | 1:40 |
| M. phlei | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0 |

Bei der Auswertung zeigte sich (Tabelle 6), daß die aus dem Stamm P II und aus M. phlei hergestellten Antigene für die KBR völlig unbrauchbar waren. Die Gebrauchstiter der vier übrigen Antigene lagen für P IV bei 1 : 30, für P III und C 286 bei 1 : 40 und für P V bei 1 : 80.

Es muß nun allerdings hervorgehoben werden, daß bei der Verwendung dieser Antigene in der KBR einige Schwierigkeiten auftraten. Einmal waren die Suspensionen sehr dicht und nicht beständig, d. h., sie sedimentierten verhältnismäßig schnell. Ein weiterer Nachteil lag darin, daß sie bei der Antigenauswertung in den niederen Verdünnungen (1 : 10 und 1 : 20) eine zum Teil starke antikomplementäre Wirkung zeigten, die allerdings durch eine der Komplementauswertung entsprechende Komplementmenge ausgeglichen werden konnte.
Ausschlaggebend für die Ablehnung dieser Antigene war aber die Tatsache, daß ihre Reaktionsstärke geringer war als die des Vergleichsantigens "Utrecht I" (Tabelle 7).

**Tabelle 7**

Vergleich der ersten Antigengruppe mit dem Antigen „Utrecht I".

| | Serum 994 | | | | Serum B 27 | | | | Serum 1011 | | | | negatives Serum | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 |
| P III | 4 | 3 | 1 | — | 4 | 3 | 2 | ± | 4 | 3 | 1 | — | — | — | — | — |
| P IV | 4 | 3 | 2 | 1 | 4 | 3 | 1 | — | 4 | 2 | 1 | — | — | — | — | — |
| P V | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 | 3 | 1 | — | — | — | — | — |
| C 286 | 4 | 3 | 2 | 1 | 4 | 4 | 1 | — | 4 | 4 | 2 | — | — | — | — | — |
| Utrecht I | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | — | — | — | — |

Aus der **Tabelle 7** ist ersichtlich, daß die Reaktionen mit den positiven Seren 994, B 27, 1011, die von wegen Paratuberkulose geschlachteten Rindern stammten, wohl in den niederen Serumverdünnungen, wie 1 : 5 und zum Teil 1 : 10, in ihrer Stärke übereinstimmten, daß aber in den höheren Serumverdünnungen die eigenen Antigene erheblich in ihrer Wirksamkeit gegenüber den Kontrollantigenen abfielen.

**b) Behandlung im Homogenisator 5 Minuten lang**

Die Auswertung der ersten Gruppe der hergestellten Antigene sowie ihr Verhalten bei der Anwendung in der KBR wiesen darauf hin, daß die Beschaffenheit der Antigene geändert werden mußte. Es war klar zu erkennen, besonders unter Einbeziehung der Vergleichsantigene, daß ein auch arbeitstechnisch gut geeignetes Antigen eine homogene Flüssigkeit ohne gröbere Beimengungen und mit möglichst geringem Trübungsgrad sein muß. Um nun eine feine Verteilung der Paratuberkelbakterien zu erreichen, wurde eine Bearbeitung der Aufschwemmungen im Homogenisator vorgenommen.

Es wurden Kulturen von festen Nährböden verwendet, die 4 Wochen bei 37° C bebrütet worden waren. Jedes Röhrchen wurde mit 3 ccm einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung beschickt und der Bakterienrasen mit einem Glasstab vorsichtig darin aufgeschwemmt, wobei darauf geachtet wurde, möglichst keine Nährbodenteile mit in die Aufschwemmung gelangen zu lassen. Es erfolgte dann ein dreimaliges Auswaschen der Bakterienaufschwemmung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung und Abdrücken des feuchten Bakterienrückstandes mit Fließpapier. Die gewogenen feuchten Bakterien wurden wieder im Verhältnis 1 : 10 in 0,5 %iger Karbolkochsalzlösung aufgenommen und die Bakteriensuspension für 5 Minuten im Homogenisator bei Stufe 10 bearbeitet. Es entstand dadurch eine leicht gelbliche, rahmartige Flüssigkeit, die zunächst durch Mull filtriert und dann 10 Minuten bei 2000 U/Min. zentrifugiert wurde.

Bei den Antigenen dieser Gruppe, ausgenommen M. avium, stand über dem Bodensatz eine vollkommen homogene, leicht milchig aussehende Flüssigkeit. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen, 1 Stunde im Wasserbad bei 60° C gehalten und dann auf ihre Wirksamkeit als Antigen in der Antigenauswertung geprüft. Bei M. avium war die überstehende Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren wässerig-klar. Auf diese Weise wurden die Paratuberkelstämme P II, P III, P IV, P V, Strain 18, C 286, C 300, C Hull, 3384, 3390 sowie M. avium und M. phlei bearbeitet.

Bei der Auswertung einiger Antigene dieser Gruppe erwies es sich als notwendig, eine Vorprüfung der einzelnen Antigene in nur einer Reihe mit einem positiven Serum vorzunehmen, da der Endtiter dieser Antigene

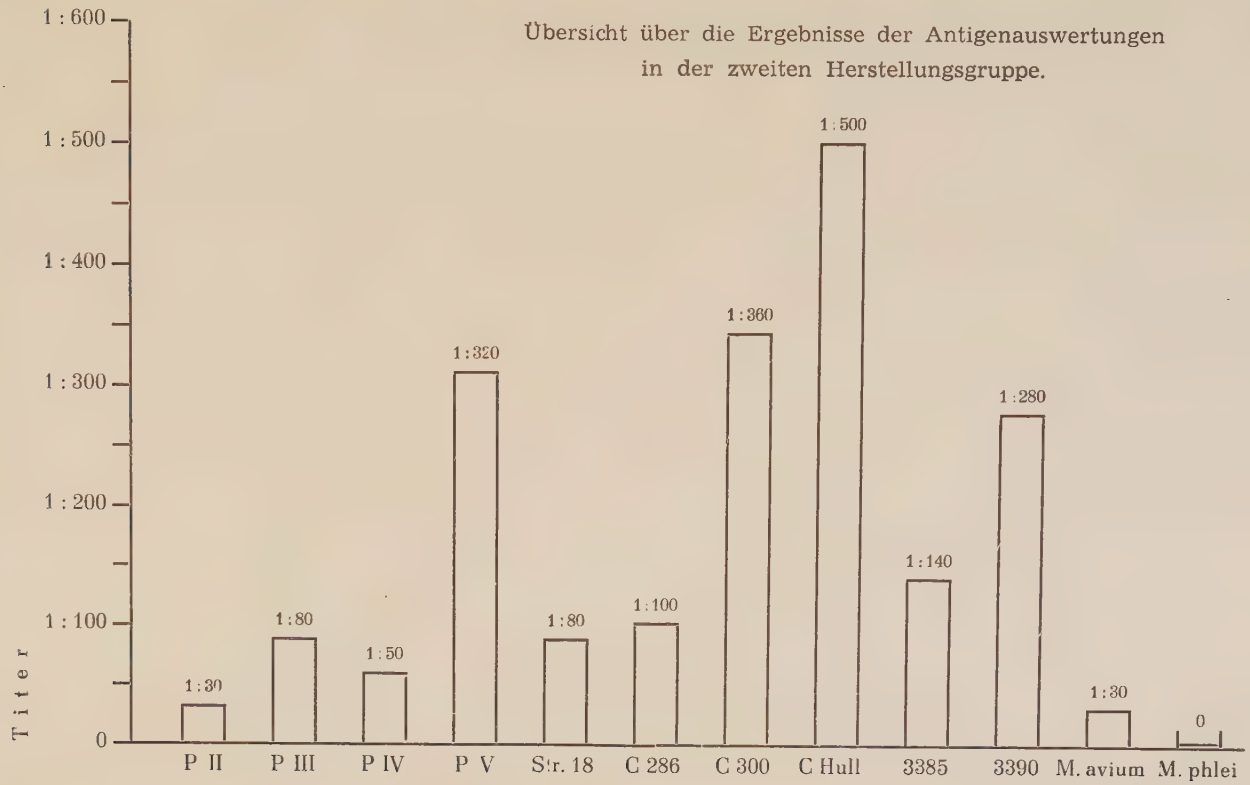
außerhalb des Bereiches der bisher angewandten Auswertungstechnik lag. Es wurden zunächst größere Verdünnungsabstufungen der Antigene gewählt, und zwar 1 : 50, 1 : 100, 1 : 150 bis 1 : 600, um dann bei der genauen Austitrierung nur den Bereich des Umschlages in der Vorprüfung mit geringen Unterschieden der Antigenkonzentration zu prüfen.

Als Beispiel soll das Antigen C 300 angeführt werden:

In der Verdünnung 1 : 350 gab das Antigen eine ++++-Reaktion, in der Verdünnung 1 : 400 dagegen nur eine +++-Reaktion, daher wurden dann für die genaue Bestimmung des Titers die Verdünnungen 1 : 350 bis 1 : 450 in der üblichen Art der Antigenauswertung angesetzt, wobei die Verdünnung 1 : 360 als Gebrauchskonzentration ermittelt wurde.

Die Ergebnisse der Auswertungen sind in der Übersicht 1 zusammengestellt.

**Übersicht 1**


Übersicht über die Ergebnisse der Antigenauswertungen
in der zweiten Herstellungsgruppe.
Titer
1 : 600
1 : 500
1 : 400
1 : 300
1 : 200
1 : 100
0
1:30
1:80
1:50
1:320
1:80
1:100
1:360
1:500
1:140
1:280
1:30
0
P II
P III
P IV
P V
Str. 18
C 286
C 300
C Hull
3385
3390
M. avium
M. phlei

Aus der Übersicht 1 geht hervor, daß die Antigene aus den Stämmen P II, P III, P IV und Strain 18 in ihrer Wertigkeit bedeutend niedriger liegen als die aus den übrigen Stämmen hergestellten Antigene.
C 286 und 3384 nehmen eine Mittelstellung ein, während die Gebrauchstiter der Stämme C 300, C Hull, 3390 und P V sehr hohe Verdünnungen der Antigene sind. M. phlei war als Antigen unbrauchbar, und die Wertigkeit von M. avium im Vergleich zu den Paratuberkelstämmen mit dem Titer 1 : 30 recht gering.

**c) Behandlung im Homogenisator 15 Minuten lang**

In der nächsten Herstellungscharge wurden wieder die zur Verfügung stehenden 10 Paratuberkelstämme sowie M. avium und M. phlei verwendet.

Die Herstellungsweise wurde gegenüber der vorhergehenden in zwei Punkten abgeändert. Um die Wägungen genauer durchführen zu können, als es mit feuchten Bakterien möglich ist, und damit genau entsprechende Gewichtsverhältnisse für die einzelnen Stämme zu erhalten, wurden getrocknete Bakterien als Ausgangsmaterial verwendet. Die Trocknung der Bakterien erfolgte nach dem Auswaschen der abfiltrierten Kulturen mit physiologischer Kochsalzlösung im Brutschrank bei 37° C über zwei bis drei Tage. Die getrockneten Bakterien wurden dann im Mörser zerrieben und 0,5 g des Pulvers in 10 ccm einer 0,5 %igen Karbolkochsalzlösung suspendiert. Der zweite Unterschied gegenüber der vorhergehenden Herstellungsweise lag darin, daß die Bearbeitung im Homogenisator für die Dauer von 15 Minuten durchgeführt wurde.

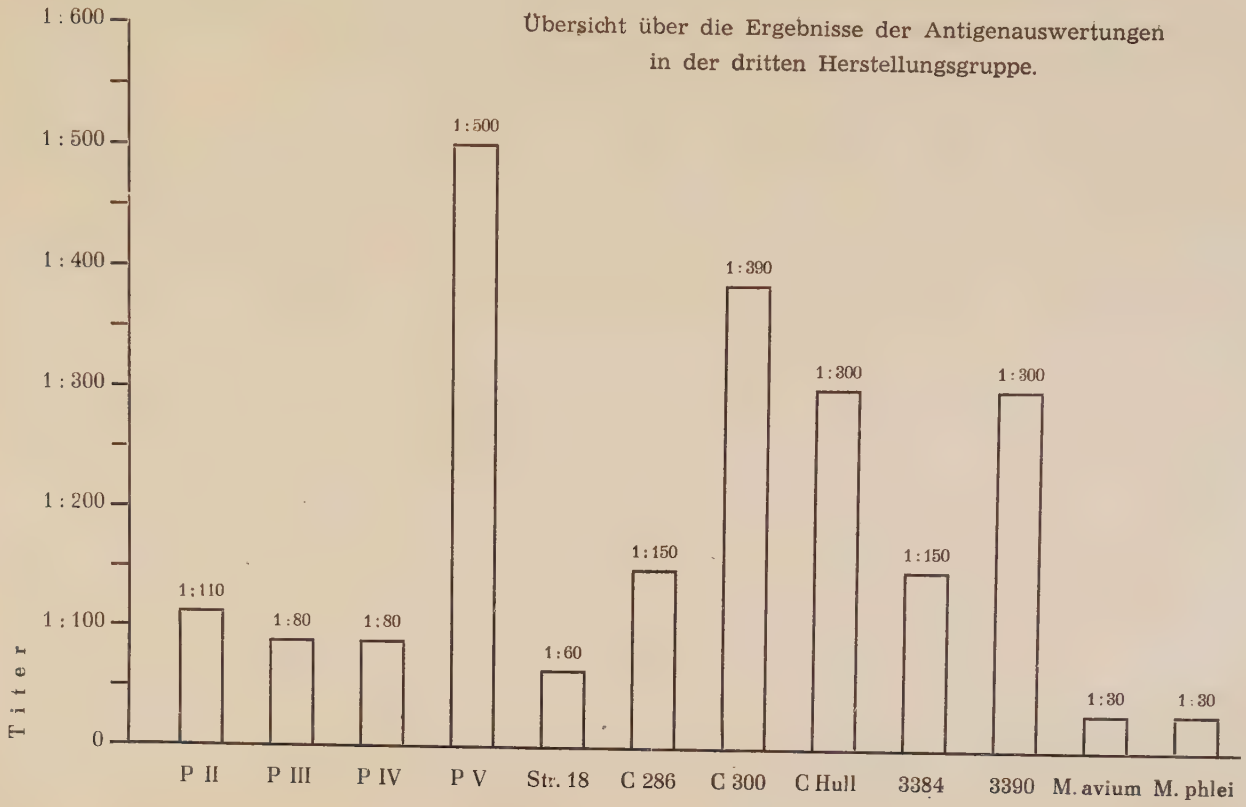
Bei M. avium war der Überstand nach dem Zentrifugieren nahezu wasserklar, leicht opalisierend, während bei allen übrigen Stämmen wieder ein homogenes, leicht milchig aussehendes Antigen erhalten wurde.

Die Antigenauswertung erfolgte für alle Stämme in der bereits angegebenen Weise zunächst in der Vorprüfung mit großen Abstufungen, an die sich dann die genaue Austitrierung anschloß.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in der Übersicht 2 zusammengestellt.

**Übersicht 2**

Übersicht über die Ergebnisse der Antigenauswertungen in der dritten Herstellungsgruppe.



Die Übersicht zeigt, daß die Gebrauchstiter der Paratuberkelstämme P III, P IV und Strain 18 mit 1 : 80 bzw. 1 : 60 wieder bedeutend niedriger liegen als die der übrigen Stämme. Die Wertigkeit von P II beträgt 1 : 110 und liegt höher als bisher, während C 286 und 3384 mit dem Titer 1 : 150 wiederum eine Mittelstellung einnehmen. Auffallend ist, wie bei der vorhergehenden Herstellung, der große Wirkungsbereich der Stämme C 300, C Hull, 3390 und P V, deren Gebrauchstiter 1 : 390, 1 : 300 bzw. 1 : 500 sind. Die Wertigkeit von M. avium ist mit 1 : 30 unverändert geblieben, während M. phlei, das sich vorher als unwirksam erwiesen hatte, jetzt ebenfalls in der Verdünnung 1 : 30 als Antigen zu verwenden ist.

**d) Karbolsäureextrakte**

Obgleich die wässerigen Extrakte aus Paratuberkelbakterien in ihrer Titerhöhe und Arbeitsweise zufriedenstellende Antigene darstellten, wurde versucht, in Anlehnung an eine Arbeit von Paarmann (1935) eine andere Extraktionstechnik anzuwenden. Paarmann hatte eine billige Methode gesucht, die für die Herstellung aller in seinem Institut notwendigen Antigene gleichermaßen gut geeignet waren. Er fand, daß die Extraktion der Bakterien mit konzentrierter Karbolsäure gute Ergebnisse lieferte und stellte nach dieser sog. „Danziger Methode" Antigene aus Tuberkel-, Rotz-, Ab. Bang-Bakterien sowie aus Gonokokken und Spirochäten her.

Als Ausgangsmaterial für die Paratuberkulose-Antigene dienten getrocknete Bakterien von flüssigen Kulturen. Von jedem Stamm wurden jeweils gleiche Mengen der getrockneten, zerriebenen Bakterien tropfenweise mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, bis das gesamte Material durchfeuchtet war. Es kam dann für 3 Stunden in den Brutschrank, um eine Aufquellung der Bakterien zu erreichen und der Karbolsäure eine günstigere Angriffsfläche zu geben. Die in einem Zentrifugenglas befindliche Bakterienmasse wurde anschließend mit der 5fachen Menge konzentrierter, durch Erwärmen verflüssigter Karbolsäure versetzt und gut durchgemischt. Die verschlossenen Röhrchen sind dann 48 Stunden lang im Wasserbad bei 60° C gehalten worden. Während der Extraktionszeit wurde der Inhalt der Röhrchen mehrmals kräftig durchgeschüttelt. Nach diesem Vorgang hatte die Bakterienmasse ein glasiges, durchscheinendes Aussehen bekommen und die überstehende Flüssigkeit — Karbolsäure — war klar, bräunlich-gelblich verfärbt und behielt diese Eigenschaft auch nach dem Erkalten bei. Darauf wurden die Röhrchen zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit abgenommen und 1 ccm der Karbolsäure zu 99 ccm physiologischer Kochsalzlösung gegeben und die Mischung gut durchgeschüttelt. Bei der Verdünnung der Karbolsäure trat eine feine weiße Ausflockung auf, die auch von Paarmann erwähnt wird und

nach seinen Prüfungen keinen Einfluß auf die antigene Wirksamkeit der Extrakte hat.

Diese Karbolsäurekochsalzverdünnung 1 : 100 stellte nun das konzentrierte Antigen dar, das in der üblichen Weise ausgewertet wurde. Die Ergebnisse der Auswertungen sind aus Tabelle 8 zu ersehen.

**Tabelle 8**

Übersicht über die Ergebnisse der Auswertungen der Karbolsäureextrakte.

| | konz. | 1 : 10 | 1 : 20 | 1 : 30 | 1 : 40 | 1 : 50 | 1 : 60 | 1 : 70 | 1 : 80 | 1 : 90 | 1 : 100 | Gebrauchs-konzentr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P II | + | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 10 |
| P III | + | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 10 |
| P IV | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — | 0 |
| P V | + | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 20 |
| Strain 18 | + | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 10 |
| C 286 | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 5 |
| C 300 | + | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 20 |
| C Hull | + | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 30 |
| 3390 | + | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 10 |
| M. avium | + | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | 1 : 30 |
| M. phlei | + | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 0 |

Im Gegensatz zu den vorher hergestellten Antigenen ist die Wertigkeit der Karbolsäureextrakte als unzureichend zu bezeichnen, da nur der Stamm C Hull einen Titer 1 : 30 erreicht, während die übrigen Stämme noch schlechtere Titerwerte ergaben. Obwohl das Antigen aus M. avium in den früheren Herstellungsreihen am schwächsten war, so fällt in dieser Versuchsreihe auf, daß der Titer nicht im gleichen Maße wie bei den anderen Antigenen abgesunken ist, sondern auf der gleichen Höhe verblieb. Der Extrakt aus M. phlei ist wiederum als Antigen unbrauchbar.

In Tabelle 9 sind die Endtiter der aus den verschiedenen Stämmen nach unterschiedlichen Verfahren hergestellten Antigene zusammengestellt.

**Tabelle 9**

Zusammenstellung der Endtiter der aus den einzelnen Mycobakterienstämmen nach den verschiedenen Methoden hergestellten Antigene.

| Stamm | Herstellungsverfahren | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Mörser | 5 Min. Homogenisator | 15 Min. Homogenisator | Karbolsäure |
| P II | 0 | 1 : 30 | 1 : 110 | 1 : 10 |
| P III | 1 : 40 | 1 : 80 | 1 : 80 | 1 : 10 |
| P IV | 1 : 30 | 1 : 50 | 1 : 80 | 0 |
| P V | 1 : 80 | 1 : 320 | 1 : 500 | 1 : 20 |
| Strain 18 | | 1 : 80 | 1 : 60 | 1 : 10 |
| C 286 | 1 : 40 | 1 : 100 | 1 : 150 | 1 : 5 |
| C 300 | | 1 : 360 | 1 : 390 | 1 : 20 |
| C Hull | | 1 : 500 | 1 : 300 | 1 : 30 |
| 3384 | | 1 : 140 | 1 : 150 | 1 : 10 |
| 3390 | | 1 : 280 | 1 : 300 | 1 : 10 |
| M. avium | | 1 : 30 | 1 : 30 | 1 : 30 |
| M. phlei | 0 | 0 | 1 : 30 | 0 |

Wenn man die Wirksamkeit der aus den einzelnen Paratuberkelbakterienstämmen nach den vier verschiedenen Methoden hergestellten Antigene vergleicht, so sieht man, daß die nach der Mörser- und Karbolsäuremethode hergestellten Antigene im Gegensatz zu den beiden im Homogenisator hergestellten viel niedrigere Titer aufwiesen. Selbst wenn nach der Mörsermethode sämtliche Stämme bearbeitet worden wären, wäre das Resultat nicht besser ausgefallen, da schon die makroskopische Beschaffenheit dieser Antigene ungünstig war.

Die einzelnen Paratuberkelbakterienstämme erwiesen sich in ihrer Brauchbarkeit zur Antigenherstellung als sehr unterschiedlich. In weitem Abstand heben sich durch ihre Titerhöhe die Stämme P V (1 : 500), C 300 (1 : 390), C Hull (1 : 500 bzw. 1 : 300) und der Stamm 3390 (1 : 300) heraus. Es folgen dann mit niedrigeren Titern die Stämme 3384 (1 : 150) und C 286 (1 : 150). Eine geringe antigene Wirksamkeit entfalten die Stämme P II (1 : 110), P III (1 : 80), P IV (1 : 80) und Strain 18 (1 : 80).

Die aus M. avium hergestellten Antigene wiesen einen gleichbleibenden niedrigen Titer von 1 : 30 nach allen Herstellungsmethoden auf.

Die Antigene, die aus dem M. phlei gewonnen wurden, lieferten die unbrauchbarsten Resultate, da es nur nach einer der Homogenisatormethoden (15 Minuten) einen Titer von 1 : 30 ergab.

Nun ist aber keineswegs aus der Titerhöhe allein auf die Wirksamkeit und die Spezifität der Antigene bei der diagnostischen Anwendung ohne weiteres ein Schluß erlaubt. Das Verhalten der einzelnen Antigene mußte deshalb noch in der Komplementbindungsreaktion an zahlreichen positiven, verdächtigen und negativen Seren geprüft werden.

### B. Diagnostische Untersuchung von Blutproben mit Hilfe der KBR unter Verwendung verschiedener Antigene und deren Vergleich.

Die Brauchbarkeit der nach der Homogenisatormethode hergestellten Antigene wurde in der KBR an Rinder- und Schafseren geprüft, die von Tiergesundheitsämtern und praktischen Tierärzten zum Zwecke der Diagnose an das Tierhygienische Institut der Universität München eingesandt wurden. Die Blutproben stammten in allen Fällen von paratuberkuloseverdächtigen Rindern oder Schafen und von solchen Tieren, die in bekannten paratuberkuloseverseuchten Beständen standen. In der Hauptsache handelte es sich dabei um Tiere aus tuberkulosefreien Beständen, nur bei einigen Proben waren keine näheren Angaben über die Tuberkuloseverseuchung des Herkunftsbestandes gemacht worden. Für die Vergleichsuntersuchungen wurden jeweils die selbsthergestellten Antigene verwendet, die zum Zeitpunkt der Einsendung zur Verfügung standen.

In einer **1. Versuchsreihe** wurden 66 Blutproben mit den Antigenen 3390, C 300 und C Hull vergleichend untersucht. Zur Kontrolle wurde auch noch das holländische Antigen „Utrecht I" benützt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 10 zusammengestellt worden.

**Tabelle 10**

| | Serum-kontrolle | Utrecht I 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | 3390 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | C 300 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | C Hull 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 | — | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 3 | 3 | 3 | 2 | + |
| 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 | — | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 3 | 1 | — | s+ | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 6 | — | — | — | — | — | — | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 3 | 1 | 1 | v | 2 | — | — | — | v |
| 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 10 | — | 1 | — | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 11 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 12 | — | — | — | — | — | — | 3 | 2 | 2 | — | v | 3 | 2 | 2 | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 13 | — | 4 | 4 | 1 | — | s+ | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 3 | 2 | 2 | + |
| 14 | — | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 15 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 16 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 17 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 18 | — | 1 | 1 | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 2 | 1 | — | v | 2 | 1 | 1 | — | v |
| 19 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 21 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Fortsetzung Tabelle 10

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 23 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 24 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 25 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 26 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 27 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 28 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 29 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 30 | — | 4 | 4 | 1 | — | s+ | 4 | 4 | 1 | — | + | 4 | 4 | 2 | — | + | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 31 | — | 3 | 1 | — | — | v | 4 | 3 | 1 | — | s+ | 3 | 3 | 1 | — | v | 3 | 2 | — | — | v |
| 32 | — | 1 | — | | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 33 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 34 | — | 4 | 2 | — | — | v | 4 | 4 | 2 | — | + | 4 | 4 | 2 | — | + | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 35 | — | 4 | 2 | 1 | — | s+ | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 4 | 2 | — | + | 4 | 2 | 1 | — | + |
| 36 | — | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 2 | 1 | — | v | 2 | 2 | 1 | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 37 | — | 4 | 3 | 1 | — | s+ | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 38 | — | 3 | — | — | — | — | 3 | 3 | — | — | v | 3 | 2 | — | — | v | 3 | 2 | — | — | v |
| 39 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 40 | — | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v |
| 41 | — | 3 | — | — | — | — | 3 | 3 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v |
| 42 | — | 4 | 4 | 4 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| 43 | — | — | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 44 | — | | | — | — | — | 2 | 2 | 1 | — | v | 2 | 2 | 1 | 1 | v | 2 | 1 | 1 | — | + |

Fortsetzung Tabelle 10

| | Serum-kontrolle | Utrecht I 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | 3390 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | C 300 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | C Hull 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 45 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 46 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 47 | — | 2 | 1 | — | — | v | 4 | 4 | 3 | 1 | + | nicht untersucht | | | | | 4 | 3 | 2 | 1 | + |
| 48 | — | 1 | — | — | — | — | 3 | 3 | 2 | 1 | s+ | „ | | „ | | | 3 | 3 | 2 | 1 | s+ |
| 49 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | „ | | „ | | | — | — | — | — | — |
| 50 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | „ | | „ | | | — | — | — | — | — |
| 51 | — | 3 | — | — | — | — | 3 | 2 | — | — | v | „ | | „ | | | 3 | 2 | — | — | v |
| 52 | — | 4 | 2 | 1 | — | s+ | 4 | 4 | 4 | 1 | + | „ | | „ | | | 4 | 4 | 4 | 1 | + |
| 53 | — | 2 | — | — | — | — | 4 | 3 | 1 | — | s+ | „ | | „ | | | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 54 | — | 1 | — | — | — | — | 4 | 3 | 3 | — | + | „ | | „ | | | 4 | 3 | 3 | — | + |
| 55 | — | 1 | — | — | — | — | 4 | 3 | 1 | — | s+ | „ | | „ | | | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 56 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | „ | | „ | | | — | — | — | — | — |
| 57 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | „ | | „ | | | — | — | — | — | — |
| 58 | — | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | „ | | „ | | | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 59 | — | 4 | 1 | — | — | v | 4 | 4 | 2 | 1 | + | „ | | „ | | | 4 | 4 | 3 | 1 | + |
| 60 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + |
| 61 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + |
| 62 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 63 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 64 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 65 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 2 | + | 4 | 3 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 66 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Aus der Tabelle geht hervor, daß die selbsthergestellten Antigene 3390, C 300 und C Hull in der KBR durchweg bessere Resultate ergaben als das holländische Vergleichsantigen.

Von 66 Blutproben reagierten unter Verwendung der eigenen Antigene 22 positiv, 11 zweifelhaft und 33 negativ. Mit dem Antigen „Utrecht I" wurden dem gegenüber 14 positive, 6 zweifelhafte und 46 negative Reaktionen erzielt. In 8 Fällen versagte das Antigen Utrecht I offensichtlich, denn es hatte gegenüber den eigenen Antigenen viermal an Stelle einer positiven Reaktion nur eine fragliche und viermal sogar eine negative angezeigt. Die etwas geringere Wirksamkeit drückte sich auch in der Reaktionsstärke aus. Während das holländische Antigen nur in 7 der positiven Fälle einen Titer bis zur Serumverdünnung 1 : 40 aufwies, ist dieser Titer bei Verwendung der eigenen Antigene 3390, C 300 und C Hull in 13 Fällen erreicht worden.

In einer **2. Versuchsreihe** erfolgte die Prüfung von 65 unter gleichen Vorberichten eingesandten Blutproben mit den originellen Antigenen „A" und Utrecht I sowie dem eigenen Antigen Strain 18. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11 zusammengestellt worden.

**Tabelle 11**

| | Serum-kontrolle | Antigen „A" homog. 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | Utrecht I 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | Strain 18 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — |
| 2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — |
| 7 | — | — | — | — | — | — | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 1 | — | — | v |
| 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 10 | — | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — |
| 11 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 12 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| 13 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — |
| 14 | — | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 15 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 16 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 17 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 18 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 19 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 21 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Fortsetzung Tabelle 11

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22 | – | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 23 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 24 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 25 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 26 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 27 | — | 4 | 3 | — | — | v | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 28 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 29 | – | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| 30 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 31 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 32 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 33 | – | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 34 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 35 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 36 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 37 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 38 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 39 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 40 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 41 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 42 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 43 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 44 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Fortsetzung nächste Seite!

Fortsetzung Tabelle 11

| | Serum-kontrolle | Antigen „A" homog. 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | Utrecht I 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | Strain 18 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 45 | — | 1 | — | | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 46 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 47 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 48 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 49 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 50 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 51 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 52 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 53 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 54 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 55 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 56 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 57 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 58 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 59 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 60 | — | 2 | 1 | — | — | v | 4 | 3 | 1 | — | s+ | 4 | 2 | 1 | — | s+ |
| 61 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 62 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 63 | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 64 | — | — | — | — | — | — | 3 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 65 | — | 4 | 3 | — | — | s+ | 4 | 4 | 4 | 3 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + |

Das eigene Antigen Strain 18 besaß, wie sich bei der Auswertung schon gezeigt hatte, keine hohe Wertigkeit und erwies sich in dieser Versuchsreihe dem Antigen Utrecht I gegenüber nicht als überlegen. Beide Antigene stimmten in ihren Ergebnissen und auch in den Titerhöhen weitgehend überein. Im Vergleich zur ersten Versuchsreihe kann die Leistungsfähigkeit dieser Antigene nicht als besonders hoch angesehen werden. Von noch geringerer Wirkamkeit erwies sich aber das Antigen „A". Die erreichten Titer lagen stets unter den mit den anderen Antigenen erzielten Titern und machten deshalb meistens auch eine abweichende Beurteilung der Reaktionen notwendig.

In einer **3. Versuchsreihe** erfolgte die vergleichende Prüfung von 30 Blutproben von Rindern bzw. Schafen (S) in der KBR mit den eigenen Antigenen aus den Stämmen 3390 bzw. 3384 und dem Antigen Utrecht II. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 12 zusammengestellt worden.

**Tabelle 12**

| | Serum-kontrolle | Utrecht II 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | 3390 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung | 3384 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| 2 | — | 3 | 2 | — | — | v | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | 1 | + |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 3 | 3 | 2 | + |
| 5 | — | 4 | 4 | 4 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 1 | + |
| 6 | — | 3 | 1 | 1 | 1 | v | 4 | 2 | 1 | — | + | 4 | 4 | 3 | — | + |
| 7 | — | 4 | 4 | 2 | — | + | 4 | 4 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 8 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 9 | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 3 | 3 | 2 | 1 | + |
| 10 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 11 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 12 | — | | | | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 2 | 1 | — | v |
| 13 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v |
| 14 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 3 | + |
| 15 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + |

Fortsetzung Tabelle 11

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | — | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 3 | 3 | 2 | + |
| 17 | — | 1 | — | — | — | — | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — |
| 18 S | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 4 | 2 | + |
| 19 S | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 20 S | — | 4 | 4 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 21 S | — | 4 | 3 | 1 | 1 | s+ | 4 | 3 | 3 | 1 | s+ | 4 | 3 | 2 | — | s+ |
| 22 S | — | 4 | — | — | — | v | 4 | 1 | — | — | v | 4 | 1 | — | — | v |
| 23 S | — | 4 | 2 | 1 | 1 | v | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | 1 | + |
| 24 S | — | — | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v |
| 25 S | — | 2 | 1 | 1 | — | v | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + |
| 26 S | — | 3 | 3 | 1 | — | v | 4 | 4 | 4 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + |
| 27 S | — | — | — | — | — | — | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 2 | — | — | v |
| 28 S | — | — | | — | — | — | 3 | 2 | 2 | — | v | 3 | 2 | 1 | — | v |
| 29 S | — | | — | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 3 | 3 | — | — | v |
| 30 S | — | — | — | — | — | — | 2 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — |

Von den 30 Blutproben reagierten unter Verwendung der eigenen Antigene übereinstimmend 18 positiv, 4 zweifelhaft und 5 negativ. Zusätzlich ergaben mit dem Antigen 3384 die Seren von 3 Tieren, die mit dem Antigen 3390 negativ reagierten, noch eine zweifelhafte Reaktion. Mit dem Antigen Utrecht II wurden insgesamt 13 positive, 6 zweifelhafte und 11 negative Reaktionen erzielt. Im Vergleich zu den eigenen Antigenen kam es dabei in 5 Fällen an Stelle von positiven Reaktionen zu zweifelhaften und in 6 Fällen an Stelle von zweifelhaften zu negativen Reaktionen.

Daraus ergibt sich, daß die Wirksamkeit des Antigens Utrecht II in der KBR geringer war als die der eigenen Antigene und daß das Antigen 3384 noch stärker anzeigte als das Antigen 3390.

In einer **4. Versuchsreihe** wurde bei der Untersuchung von 36 Rinderseren die Wirkungsweise der eigenen Antigene C 300 und Strain 18 mit einem aus Mycobacterium avium hergestellten Antigen verglichen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

**Tabelle 13**

| | Serum-kontrolle | C 300 1:5 | C 300 1:10 | C 300 1:20 | C 300 1:40 | Beur-teilung | Strain 18 1:5 | Strain 18 1:10 | Strain 18 1:20 | Strain 18 1:40 | Beur-teilung | M. avium 1:5 | M. avium 1:10 | M. avium 1:20 | M. avium 1:40 | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | — | 2 | 1 | — | — | v | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — |
| 2 | — | 2 | 1 | — | — | v | 1 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — |
| 3 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | — | + |
| 4 | — | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 3 | 2 | — | + | 3 | 1 | — | — | v |
| 5 | — | 3 | 1 | — | — | v | 3 | 2 | — | — | v | — | — | — | — | — |
| 6 | — | 4 | 4 | — | — | v | 3 | 2 | — | — | v | 1 | — | — | — | — |
| 7 | — | 3 | 3 | 2 | 1 | + | 3 | 3 | 3 | 1 | + | 3 | 3 | 2 | 1 | + |
| 8 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 2 | + |
| 9 | — | 4 | 4 | 4 | 2 | + | nicht untersucht | | | | | 4 | 3 | 1 | 1 | + |
| 10 | — | 3 | 2 | — | — | v | ,, | ,, | | | | 1 | 1 | — | — | — |
| 11 | — | 3 | 1 | — | — | v | ,, | ,, | | | | 1 | — | — | — | — |
| 12 | — | 4 | 3 | — | — | v | ,, | ,, | | | | 2 | 1 | — | — | v |
| 13 | — | 4 | — | — | — | v | ,, | ,, | | | | 1 | — | — | — | — |
| 14 | — | 1 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 15 | — | 1 | — | — | — | — | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 16 | — | 3 | 3 | 1 | — | v | 3 | 1 | 1 | — | v | 1 | 1 | — | — | — |
| 17 | — | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 4 | 3 | — | + | 3 | 2 | — | — | v |
| 18 | — | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 3 | 2 | 1 | — | 2 | 1 | — | — | v |

Fortsetzung Tabelle 13

| | Serum-kontrolle | C 300 | | | | Beur-teilung | Strain 18 | | | | Beur-teilung | M. avium | | | | Beur-teilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | |
| 19 | — | 4 | 3 | 3 | — | + | 4 | 3 | 3 | 1 | + | 4 | 3 | 1 | — | s+ |
| 20 | — | 4 | 1 | — | — | v | 3 | 2 | 1 | — | v | 1 | 1 | — | — | — |
| 21 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 22 | — | 3 | 2 | 1 | — | v | 3 | 3 | 1 | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 23 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 1 | + |
| 24 | — | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 25 | — | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 3 | 3 | — | + | 4 | 3 | 3 | — | + |
| 26 | — | 2 | — | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 1 | — | — | — | — |
| 27 | — | 3 | 2 | 1 | — | v | 2 | 1 | 1 | — | v | 2 | 1 | — | — | v |
| 28 | — | 4 | 4 | 1 | — | s+ | 3 | 3 | 2 | — | v | 2 | 1 | 1 | — | v |
| 29 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 30 | — | 1 | 1 | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 1 | — | — | — | — |
| 31 | — | 2 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | — | — | v | 1 | — | — | — | — |
| 32 | — | 1 | 1 | 1 | — | — | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — |
| 33 | — | 4 | 2 | 1 | — | s+ | 4 | 3 | — | — | v | 3 | 2 | 1 | — | v |
| 34 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 2 | + | 4 | 3 | 2 | 2 | + |
| 35 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 3 | 2 | 2 | + |
| 36 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Werden die 3 Antigene einander gegenübergestellt, dann ergibt sich, daß mit dem Antigen C 300 16 positive, 10 zweifelhafte und 10 negative Reaktionen, mit dem Antigen Strain 18 12 positive, 11 zweifelhafte und 8 negative Reaktionen (5 Seren sind mit diesem Antigen nicht untersucht worden) und mit dem Antigen aus M. avium 9 positive, 9 zweifelhafte und 18 negative Reaktionen erzielt wurden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich deutlich eine Abstufung der Wirksamkeit der drei verschiedenen Antigene ablesen. Das Antigen Strain 18 arbeitet etwas schlechter als das Antigen C 300, aber noch eindeutig besser als das aus M. avium gewonnene Antigen. Das Ergebnis ist aber insofern von Bedeutung, als es eindeutig die bekannte Tatsache bestätigt, daß es bei der Untersuchung von Blutseren, die Antikörper gegen eine Mycobakterienart enthalten, in der KBR zu positiven Reaktionen mit allen aus Mycobakterienstämmen hergestellten Antigenen kommen kann.

In einer **5. Versuchsreihe** wurden 16 Seren vergleichend mit dem Antigen Utrecht II, dem eigenen Antigen C Hull und einem Antigen, das aus Mycobacterium phlei hergestellt worden war, untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 14 zusammengestellt worden.

**Tabelle 14**

| | Serum-kontrolle | Utrecht II 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beurteilung | C Hull 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beurteilung | M. phlei 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | Beurteilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 2 | — | 4 | 4 | 3 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 3 | 2 | 1 | — | v |
| 3 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 3 | 3 | 2 | 1 | + |
| 4 | — | 2 | 2 | 1 | 1 | v | 3 | 2 | 2 | 1 | v | 1 | — | — | — | — |
| 5 | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 1 | 1 | 1 | — | — |
| 6 | — | 1 | 1 | — | — | — | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 7 | — | 1 | 1 | — | — | — | 2 | 1 | 1 | — | v | 1 | 1 | — | — | — |
| 8 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 2 | 2 | 1 | — | v |
| 9 | — | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 2 | 2 | 1 | — | v |
| 10 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 3 | 3 | 3 | 2 | + |
| 11 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 3 | 3 | 3 | 2 | + |
| 12 | — | 3 | 3 | 3 | 2 | + | 4 | 3 | 3 | 3 | + | 2 | 2 | 1 | — | v |
| 13 | — | 1 | 1 | 1 | — | — | 1 | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — |
| 14 | — | 1 | 1 | 1 | — | — | 2 | 1 | 1 | — | v | 1 | — | — | — | — |
| 15 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + |
| 16 | — | 1 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

Die Ergebnisse zeigen, daß mit dem Antigen Utrecht II 10 positive, 1 zweifelhafte und 5 negative Reaktionen, mit dem Antigen C Hull 10 positive, 3 zweifelhafte und 3 negative Reaktionen auftraten. Während diese beiden Antigene annähernd gleiche Resultate lieferten, kam es unter Verwendung des Phlei-Antigens nur zu 5 positiven und 4 zweifelhaften Reaktionen.

Sowohl hinsichtlich der Beurteilung der Reaktionen als auch hinsichtlich der Stärke der Reaktionen und der Titerhöhen haben sich deutlich Unterschiede zwischen den homologen Paratuberkuloseantigenen und dem heterologen Antigen aus einem Stamm apathogener Mycobakterien ergeben. Dieser Vergleich zeigt ebenfalls, wenn auch nicht so ausgeprägt wie in der vorhergehenden 4. Versuchsreihe, daß man in der serologischen Diagnostik von Mycobakterieninfektionen immer mit gruppenspezifischen Reaktionen zu rechnen hat.

In der **6. Versuchsreihe** wurden Blutproben von 22 Rindern, die sich nach der Schlachtung als tuberkuloseerkrankt erwiesen, mittels der KBR untersucht. Die Lokalisation und Ausdehnung der tuberkulösen Veränderungen waren unterschiedlich. Für Paratuberkulose sprechende pathologisch-anatomische Veränderungen konnten bei den Tieren nicht festgestellt werden. Die Untersuchungen wurden gleichlaufend mit den Paratuberkuloseantigenen Utrecht II, C 300 und P V sowie unter Verwendung der Antigene aus M. avium und M. phlei durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 15 zusammengestellt worden.

**Tabelle 15**

Ergebnisse der Blutuntersuchung mittels der KBR von 22 tuberkulösen Rindern.

| | Serum-kontrolle | Utrecht II | | | | Beurt. | C 300 | | | | Beurt. | P V | | | | Beurt. | M. avium | | | | Beurt. | M. phlei | | | | Beurt. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | |
| 1 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 3 | 3 | 3 | + | 4 | 4 | 2 | 2 | + | 4 | 3 | 2 | 2 | + |
| 2 | — | 3 | 2 | 2 | — | v | 2 | 2 | 2 | — | v | 2 | 2 | 2 | — | v | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 2 | 1 | — | — | v |
| 3 | — | — | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | - | — | — | — | — | — |
| 6 | — | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 4 | 3 | — | + | 4 | 4 | 2 | — | + | 2 | 2 | — | — | v |
| 7 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 1 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + |
| 8 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + |
| 9 | — | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + |
| 10 | - | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + |
| 11 | — | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 3 | 3 | — | + | 4 | 3 | 2 | — | + | 4 | 1 | — | — | v | 1 | 1 | — | — | — |
| 12 | — | 1 | 1 | — | — | | 1 | 1 | — | — | — | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 13 | — | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 3 | 3 | 2 | 1 | v | 3 | 3 | 2 | 1 | v |
| 14 | — | 2 | 1 | — | — | v | 3 | 2 | 1 | — | v | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | — | 1 | — | . | — | — |
| 15 | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 2 | 1 | + | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 2 | 1 | 1 | — | v | 1 | 1 | 1 | 1 | + |
| 16 | — | 1 | — | — | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | |
| 17 | — | 1 | 1 | — | — | — | 2 | 1 | — | — | v | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 18 | — | 4 | 3 | 2 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 3 | 3 | 2 | — | v | 2 | 2 | 1 | - | v |
| 19 | — | 4 | 3 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 1 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 2 | 2 | 1 | — | v | 2 | 2 | 1 | - | v |
| 20 | — | 4 | 4 | 3 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 3 | 2 | 2 | + | 3 | 3 | 2 | 1 | + |
| 21 | — | 4 | 4 | 3 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 3 | + | 4 | 4 | 4 | 4 | + | 4 | 4 | 3 | 2 | + | 3 | 3 | 3 | 2 | + |
| 22 | — | 3 | 3 | 3 | 2 | + | 4 | 3 | 3 | 2 | + | 4 | 4 | 3 | 3 | + | 1 | 1 | — | — | v | 2 | 1 | 1 | — | v |

Mit den Paratuberkuloseantigenen wurde bei 14 Seren ein positives, bei 3 ein zweifelhaftes und bei 5 ein negatives Resultat erzielt. Unter Verwendung des Antigens aus M. avium reagierten 9 Seren positiv, 4 zweifelhaft und 9 negativ, mit dem Phlei-Antigen 8 positiv, 5 zweifelhaft und 9 negativ. Auch die Ergebnisse dieser Versuchsreihe weisen wieder auf den gruppenspezifischen Charakter der Seroreaktionen mit Mycobakterienantigenen hin. Dabei ist auffallend, in welch hohem Maße es zu positiven Reaktionen und zu hohen Titern kam. Dies dürfte in der Hauptsache darauf zurückzuführen sein, daß bei der Mehrzahl der geschlachteten Rinder entweder sehr ausgedehnte tuberkulöse Veränderungen in mehreren Organen oder akute Generalisationsformen vorlagen. Bei solchen Formen treten Antikörper im Blute häufiger und auch in größerer Zahl auf als beim Vorliegen geringgradiger tuberkulöser Veränderungen.

In einer **7. Versuchsreihe** kamen noch Blutproben von 9 gesunden Rindern zur Untersuchung, deren Zerlegungsbefund weder den Verdacht auf das Vorliegen von Tuberkulose noch von Paratuberkulose ergab. Es wurden wie bei der Untersuchung der tuberkulösen Rinder die Antigene Utrecht II, C 300, P V, M. avium und M. phlei verwendet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 16 zusammengestellt worden.

**Tabelle 16**

Ergebnisse der Blutuntersuchung mittels der KBR von 9 tuberkulose- und paratuberkulosefreien Rindern.

| | Serum-kontrolle | Utrecht II | | | | C 300 | | | | P V | | | | M. avium | | | | M. phlei | | | | Beurteilung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | 1:5 | 1:10 | 1:20 | 1:40 | |
| 1 | — | 1 | — | — | — | 1 | 1 | 1 | — | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | — | — | — | — | — | — | — | |
| 2 | — | 1 | 1 | — | — | 2 | 1 | — | — | 1 | 1 | 1 | — | 1 | — | — | — | 1 | — | — | — | —,v |
| 3 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — | — | — | | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 7 | — | 1 | — | — | — | 2 | 2 | — | — | 2 | 1 | — | — | 1 | — | — | — | — | — | — | — | —,v |
| 8 | — | — | — | — | — | 1 | 1 | — | — | 1 | 1 | — | — | 1 | — | — | — | | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | | — |

Unter Verwendung der Antigene C 300 und P V waren zwei Seren als verdächtig zu beurteilen, während die übrigen Antigene ausnahmslos negative Resultate ergaben.

**C. Besprechung der Untersuchungsergebnisse.**

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Antigene aus verschiedenen Partuberkelbakterienstämmen bei der diagnostischen Anwendung in der KBR Unterschiede in ihrer Wirksamkeit aufweisen. Mit den Antigenen C Hull, C 300, 3384 und 3390 konnten übereinstimmend bessere Resultate erzielt werden als mit den Antigenen Strain 18, Utrecht I und „A". Das Antigen Utrecht II nahm eine Mittelstellung zwischen beiden Gruppen ein. Es fällt auf, daß diejenigen Antigene, die einen hohen Gebrauchstiter aufwiesen, auch bei ihrer Verwendung in der KBR leistungsfähiger waren. Ob es sich hier tatsächlich um eine echte Beziehung handelt, muß allerdings dahingestellt bleiben, da es leider nicht möglich war, sämtliche Antigene in größerem Ausmaß zu prüfen. Aber selbst wenn man davon absieht, die Wirksamkeit eines Antigens in der KBR nach der Höhe des Gebrauchstiters zu beurteilen, so besteht der Wert eines solchen Antigens doch darin, daß nur geringe Mengen für die Untersuchungen benötigt werden.

Ohne Zweifel beruhen die unterschiedlichen Resultate der einzelnen Untersucher, die sich mit der serologischen Diagnose der Paratuberkulose befaßten, nicht nur auf bestimmten Unterschieden in der Technik, sondern auch darauf, daß die Antigene selbst und ihre Herstellung nicht einheitlich gewesen sind. Um in der Bekämpfung der Paratuberkulose erfolgreich die serologische Untersuchungsmethode anwenden zu können, erhebt sich zwangsläufig die Forderung nach einer einheitlichen Untersuchungsmethodik, welche die Verwendung eines hoch wirksamen und allgemein eingeführten Standardantigens einschließt. Es erscheint allerdings zweckmäßig, in zweifelhaften Fällen neben einem Standardantigen noch ein zweites gutes Antigen zu verwenden. Das ist ja auch in der serologischen Diagnostik anderer Krankheiten üblich.

Die Anwendung der KBR zur Feststellung und Bekämpfung der Paratuberkulose setzt jedoch voraus, daß bei den zu untersuchenden Tieren keine Infektion mit einer anderen Art von Mycobakterien vorliegt. Diese Einschränkung der Anwendungsmöglichkeit ergibt sich eindeutig aus den Untersuchungen von Seren paratuberkuloseverdächtiger Tiere unter Verwendung der Antigene aus M. avium und M. phlei sowie aus der Untersuchung von Blutproben tuberkulöser Rinder mit diesen Antigenen und den Paratuberkuloseantigenen. Es bestehen zwar graduelle Unterschiede in der Reaktionsstärke, da die aus den homologen Mycobakterienarten hergestellten Antigene stärkere Reaktionen ergeben als die heterologen

Antigene. Es ist aber nicht möglich, auf Grund dieses Unterschiedes Infektionen mit M. paratuberculosis und Ansteckungen mit anderen Mycobakterien auseinander zu halten.

Nach Sigurdsson (1956) enthalten die Paratuberkuloseantigene neben den gruppenspezifischen sicher auch artspezifische Komponenten. Es ist bisher aber noch nicht gelungen, diese artspezifischen Fraktionen zu isolieren, um so die Spezifität der KBR zu steigern. Auch aus den Untersuchungen von Much (1912) sowie Schlossberger und Pfannenstiel (1920) geht hervor, daß eine Differenzierung der säurefesten Bakterien durch die KBR keineswegs befriedigend gelungen ist.
Much konnte zwar vier Partialantigene aus Tuberkelbakterien gewinnen und mit diesen im Tierversuch Partialantikörper erzeugen, die sich in der KBR nachweisen ließen. Die Artspezifität solcher Partialantigene ist aber noch nicht bewiesen.

Die Beurteilung der Spezifität einer serologischen Untersuchungsmethode und insbesondere der KBR bereitet meist erhebliche Schwierigkeiten. Es ist dazu notwendig, bei sämtlichen Reagenten nach der Schlachtung einen genauen Zerlegungsbefund zu erheben sowie histologische und kulturelle Prüfungen vorzunehmen. Erst dann kann ein abschließendes Urteil über den Wert eines Antigens und die Spezifität einer Reaktion abgegeben werden. Es war leider auch im Rahmen dieser Arbeit nur in wenigen Fällen möglich, die in der KBR geprüften Tiere noch anderen diagnostischen Untersuchungsmethoden zu unterziehen. Aus diesem Grund wurde auch die Beurteilung der Resultate nach dem vorne angegebenen Schema vorgenommen und erst Reaktionen in der Serumverdünnung 1 : 10 und 1 : 20 als positiv gewertet.

Abschließend muß festgestellt werden, daß unter Berücksichtigung der eben erwähnten Voraussetzungen die KBR zweifellos als ein brauchbares diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung der Paratuberkulose angesehen werden kann.

## V. Zusammenfassung.

1. Es wurden aus 10 verschiedenen Paratuberkelbakterienstämmen Antigene für die Komplementbindungsreaktion hergestellt und auf Unterschiede in ihrer Wirksamkeit geprüft.

2. Vier Stämme erwiesen sich sowohl in der Titerhöhe der Antigene als auch in ihrer Wirkungsbreite bei der Anwendung in der Komplementbindungsreaktion zur Untersuchung von Blutproben den übrigen Stämmen überlegen.

3. Die Herstellung der Antigene erfolgte nach vier verschiedenen Methoden. Durch die Bearbeitung der Bakterien im Homogenisator 15 Minuten lang konnten vollkommen homogene Suspensionen erzielt werden, die zur Verwendung als Antigen am besten geeignet waren.

4. Die Komplementbindungsreaktion erwies sich als eine brauchbare diagnostische Methode zur Erkennung der Paratuberkulose, sofern sie in tuberkulosefreien Beständen zur Anwendung kam.

5. Vergleichende Untersuchungen von Blutproben paratuberkuloseverdächtiger Rinder mit Antigenen aus M. avium und M. phlei bestätigten die bekannte Tatsache, daß Antigene aus säurefesten Bakterien bei ihrer Anwendung in der KBR nur gruppenspezifische Reaktionen geben.

6. Entsprechende Ergebnisse ergab die Untersuchung von Blutproben tuberkulöser Rinder mit Antigenen aus M. paratuberculosis, M. avium und M. phlei.

Am Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. A. Meyn für die Überlassung des interessanten Themas, die großzügige Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und für die Anregung und Förderung, der ich teilhaftig wurde, herzlich zu danken.

Ebenso möchte ich meinen besonderen Dank Herrn Dr. Th. Schliesser aussprechen, der meine Arbeiten stets in entgegenkommender Weise unterstützt hat.

## Literaturübersicht


1. Andersen, C. W. — Om Dyrkning af Paratuberkelbazillen og Forsoeg med Paratuberkulin.
Maanedskrift for Dyrlaeger, **32**, 113, 1920
zit. nach Fortmann 1925

2. Bang, B. — Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rind.
BTW, S. 759, 1906

3. Bang, O. und C. W. Andersen — Einige Untersuchungen über komplementbindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie bei paratuberkulöser Darmentzündung.
Zbl. Bakt. I. Orig. **69**, 517, 1913

4. Bang, O. — Das Geflügeltuberkulin als diagnostisches Mittel bei der chronischen pseudotuberkulösen Darmentzündung des Rindes (Johne's Disease).
Zbl. Bakt. Orig. **51**, 450, 1909

5. Behrens, H. — Die Paratuberkulose des Schafes.
DTW **62**, 129, 1955

6. Besredka, A. — Über die Fixationsreaktion bei Tuberkulose der Meerschweinchen, Kaninchen und Menschen.
Z. Imm. Forsch. **21**, 77, 1914

7. Bierbaum, A. — Die Paratuberkulose des Rindes im Regierungsbezirk Arnsberg.
Vet. med. Diss. Gießen 1950

8. Cilli, V. — L'enterite paratubercolare dei bovini.
La Nuova Vet. **10**, 449, 1932
La Nuova Vet. **11**, 23, 57, 104, 141, 207, 1933

9. Doyle, T. M. and Spears, H. N. — Johne's disease survey.
Vet. Rec. **63**, 355, 1951

10. Doyle, T. M. — Susceptibility to Johne's disease in relation to age.
Vet. Rec. **65**, 363, 1953

11. Dunkin, G. W. — A diagnostic Agent for the detection of Johne's disease and its methods of preparation.
J. Comp. Path. and Ther. **41**, 94, 1928

12. Dunkin, G. W. — A preparation of johnin from a synthetic medium without the addition of B. phlei.
J. Comp. Path. und Ther. **46**, 159, 1933

13. Mc Fadyean, Y., L. Sheater and J. T. Edwards — Johne's disease.
J. Comp. Path. and Ther. **25**, 217, 1912

14. Fischer, S. — Antigenic relationship of erythrocyte adsorbable fractions of some mycobacteria.
Austr. J. Exptl. Biol. Med. **19**, 1, 1951

15. Fortmann, A. — Die Paratuberkulose des Rindviehs im nördlichen Oldenburg.
Diss., Hannover 1925

16. Gernez-Rieux, Ch., Tacquet, A., Gaumont, R., Verge, J., Gauchy, L. — Die Haemagglutinationsreaktion (Reaktion nach Middlebrook-Dubos) bei der Paratuberkulose der Rinder (Enteritis chronica hypertrophica, Johne'sche Krankheit).
Bull. l'Acad. Vét. **23**, 465, 1950
Zit. nach Vet. Med. **3**, 491, 1950

17. Hagan, W. A. und Zeissig, A. — Studies on the control of Johne's disease.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **82**, 391, 1933

18. Hagan, A. W. — Age is a factor in susceptibility to Johne's disease.
Corn. Vet. **28**, 34, 1938

19. Hole, N. H. — Johne's disease. I. Present-day diagnosis and preliminary note on an investigation into the value of a serological method.
Vet. Rec. **64**, 601, 1952

20. Hole, N. R. — Die Diagnose der Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit).
Vortrag 15. Int. Vet.-Kongreß, Stockholm 1953

21. Huber, F. — Das Vorkommen der Paratuberkulose des Rindes in Großdeutschland.
Diss., Hannover 1941

22. Hutyra, v. F. und Marek, J. — Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere.
Nachdruck der 9. Auflage, 1952, Verlag Fischer, Jena

23. Jansen, J. — Paratuberculosis.
J. Am. Vet. Med. Assoc. **52**, 112, 1948

24. Krause, D. — Die Diagnose der Paratuberkulose des Rindes mittels der Komplementbindungsreaktion. Diss., Hannover 1954

25. Krautstrunk — Impfung mit Vogeltuberkulin zur Erkennung der paratuberkulösen Darmentzündung des Rindes. Ztschr. f. Inf.-Krankh. d. Haustiere **28**, 267, 1919

26. Larsen, A. B., Porten, D. A. und Vardaman, T. H. — A modification of the Middlebrook-Dubos hemagglutination test for use in the diagnosis of Johne's disease. Am. J. Vet. Res. **14**, 362, 1953

27. Larsen, A. B., Vardaman, T. H. und Groth, A. H. — Prelimary studies on the effect of Streptomycin and other agents on Mycobakterium paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. **11**, 374, 1950

28. Lewi, M. L. — The diagnosis of Johne's disease of cattle by microscopical and cultural examination of faeces. Vet. Rec. **60**, 336, 1948

29. Meller, R. — Beitrag zur Komplementbindung der Tuberkulose. Wien. klin. Wschr. S. 913, 1927

30. Meyer, K. F. — Über die durch säurefeste Bakterien hervorgerufene diffuse Hypertrophie der Darmschleimhaut des Rindes. Diss., Zürich 1908

31. Meyer, K. H. — Über den Nachweis der Erreger der Paratuberkulose im Kot und Darm erkrankter Tiere und Züchtung der Paratuberkelbakterien mit Hilfe des Antiforminverfahrens. Diss., Hannover 1926

32. Meyn, A. — Johne'sche Krankheit (Paratuberkulose). Mh. Tierheilk., Sonderteil Rindertuberkulose **6**, 121, 1953

33. Minett, F. C. — The diagnosis of Johne's disease by use of johnin. J. Comp. Path. and Ther. **48**, 125, 1935

34. Nag, P. Ch. — Untersuchung über Johne'sche Krankheit (Paratuberkulose) (besonders Kulturversuche, Allergie, Serologie, Immunität). Diss., München 1938

35. Paarmann, E. — Karbolsäure als Extraktionsmittel für die Herstellung spezifischer Antigene. Ztschr. f. Immunitätsf. **85**, 122, 1935

36. Pearson, J. K. L. und Mc Clelland, T. G. — Uterine infection and congenital Johne's disease in cattle. Vet. Rec. **67**, 615, 1955

37. Prohorav, P. G. — Veterinariya Moscow No. 2, 18. Abst. Vet. Bull. Weybrigde, 14, 263, 1940

38. Rankin, J. D. — Isoniazid: Its effect on Mycobakterium johnei in vitro an its failure to cure clinical Johne's disease in cattle. Vet. Res. **65**, 649, 1953

39. Rosenberger und Krause, D. — Die Diagnose der Paratuberkulose des Rindes mittels der Komplementbindungsreaktion nach Hole. DTW. **62**, 161, 1955

40. Van der Schaaf, A. u. Zantinga, J. T. — Over de Ziekte van Johne. In het bijzonder de diagnostiek. Tijdschrift voor Diergeneeskunde **80**, 1002, 1955

41. Van der Schaaf, A. — Briefliche Mitteilung 1956

42. Schaaf, J., Beerwerth, W. und Grodde, S. — Über die Paratuberkulose des Rindes, ihre Verbreitung, Diagnose und Bekämpfung. Mh. Tierheilk. Sonderteil Rindertuberkulose **8**, 144, 1956

43. Schlossberger, H., Hatoch, O., Lusena, M. und Prigge, R. — Untersuchungen über die Serodiagnostik der Tuberkulose mittels der KBR. Dtsch. med. Wschr. S. 869, 1924

44. Sigurdsson, B., Vigfusson, H. und Theodors, S. — The serological diagnosis of Johne's disease of sheep. J. comp. Path. **55**, 268, 1945

45. Sigurdsson, B. — Immunological Problems in Paratuberculosis. Bact. Rev. **20**, 1, 1956

46. Smythe, R. H. — Some observations on Johne's disease. Vet. Rec. **63**, 369, 1951

47. Spicer, A. — Johne's disease and mineral deficiency. Vet. Rec. **13**, 1304, 1933

48. Spicer, A. — Is Johne's disease infectious?
Vet. Rec. **14**, 128, 1934

49. Spicer, A. — Johne's disease.
Vet. Rec. **14**, 645, 1934

50. Taylor, A. W. — Observations on the incidance of infection with Mycobacterium johnei in cattle.
Vet. Rec. **61**, 539, 1949

51. Taylor, A. W. — Johne's disease — its diagnosis and control.
Vet. Rec. **63**, 776, 1951

52. Twort, C. C. — The agglutination and complement fixation reactions in animals, experimentally inoculated with Johne's bacillus to the other acid-fast bacilli.
Zbl. Bakt. I. Orig. **66**, 316, 1912

53. Twort, F. W. und Ingram, G. L. Y. — Further experiments with the Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosae bovis Johne and with vaccines prepared from this microorganism.
Zbl. Bakt. I. Orig. **67**, 126, 1913

54. Witebsky, E., Klingenstein, R. und Kuhn, H. — Serodiagnostische Untersuchungen bei Tuberkulose.
Klin. Wschr. **10**, 1068, 1931

55. Witebsky, E., Klingenstein, R. und Kuhn, H. — Zur Serodiagnostik der Tuberkulose.
Zbl. Bakt. I. Orig. **122**, 65, 1931

56. Witte, J. — Über die Konservierung des Komplements durch Elektrolyte.
BMTW. S. 293, 1940

57. Control of Johne's disease in cattle, sheep and goats.
Organisation for European Economic Co-Operation. Paris 1956
Project. No. 207

## Lebenslauf.

Am 22. Februar 1925 wurde ich als Tochter des Willy Schwarz und seiner Ehefrau Meta, geb. Engel, in Neutrebbin (Oderbruch) geboren.

Ich besuchte vier Jahre die Grundschule in Neutrebbin und vom Jahre 1935 an die Oberschule für Mädchen in Bad Freienwalde a. Oder, an der ich 1943 die Reifeprüfung ablegte.

Vom April 1943 bis Mai 1944 genügte ich meiner Arbeitsdienst- und Kriegshilfsdienstpflicht.

Ich begann anschließend, im Sommer-Semester 1944, in Greifswald das Studium der Naturwissenschaften, wurde dann aber nach dem ersten Semester bis zum Kriegsende dienstverpflichtet.

Nach Beendigung des Krieges nahm ich an der Ausbildung für medizinisch technische Assistentinnen in der Lehranstalt „Laboratorium am Wittenbergplatz" in Berlin teil und legte die staatliche Prüfung ab. Ich war dann vom 1. April 1949 an im Landesveterinäruntersuchungsamt in Berlin-Dahlem als med. techn. Assistentin tätig.

Im Sommer-Semester 1952 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Tierheilkunde an der Freien Universität, Berlin, das ich mit dem 6. Semester in München fortsetzte und im Dezember 1956 mit der tierärztlichen Prüfung beendete.

Die vorliegende Dissertation habe ich 1956/57 im Institut für Tierhygiene der Universität München angefertigt.

III 6/30 Kv 221/58 0,23
Druckerei und Verlag Berger & Buchner, Karl-Marx-Stadt C 1